



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CAMILLA DOS SANTOS MATEUS**

**ASSOCIAÇÃO DE ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-ANTÍGENO  
GLICOLIPÍDIO- FENÓLICO-1 COMO PARÂMETRO AUXILIAR NO  
DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE**

**FORTALEZA, 2022**

CAMILLA DOS SANTOS MATEUS

ASSOCIAÇÃO DE ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-ANTÍGENO GLICOLIPÍDIO-  
FENÓLICO-1 COMO PARÂMETRO AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DE  
HANSENÍASE

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias

Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Sacha Frota Nogueira

FORTALEZA, 2022

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)

---

- M377a Mateus, Camilla dos Santos.  
Associação de isotipos de anticorpos anti-antígeno glicolipídio- fenólico-1 como parâmetro auxiliar no diagnóstico de hanseníase / Camilla dos Santos Mateus. – 2022.  
111 f.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.  
Orientação: Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias .  
Coorientação: Profa. Dra. Paula Sacha Frota Nogueira .
1. Hanseníase. 2. *Micobacterium leprae*. 3. Anti-PGL-1. 4. Imunoglobulinas. I. Título.

CDD 615

---

CAMILLA DOS SANTOS MATEUS

ASSOCIAÇÃO DE ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-ANTÍGENO  
GLICOFENÓLICO-1 COMO PARÂMETRO AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DE  
HANSENÍASE

Tese a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aparecida Tiemi Nagao-Dias (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Clodis Maria Tavares  
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

---

Prof. Dr. Victor Santana Santos  
Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Paula Sacha Frota Nogueira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr. Alexandre Casimiro de Macedo  
Ministério da Saúde do Brasil (MS)

Ao meu querido e companheiro Rafael.

Aos meus amados pais e avós Carlos e Socorro, Francisco e Stella.

Ao meu amigo, fiel e leal irmão Gabriel.

Agradeço  
pelo apoio financeiro  
ao projeto pelas seguintes instituições:  
FUNCAP/PPSUS/SESA, processo 3966535/2017;  
MCTI/CNPq/MS-SCTIE, processo 403461/2012-0;  
e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de  
Pessoal de Nível Superior).

## **AGRADECIMENTOS**

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aparecida Tiemi Nagao- Dias, não apenas pela excelente orientação e dedicação, mas também pelo exemplo de ser humano que é. Obrigada também pela confiança, paciência e incentivo.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paula Sacha Frota Nogueira e todos os outros profissionais e alunos da Liga Acadêmica em Doenças Estigmatizantes (LADES- UFC) que participaram e colaboraram ativamente com a presente pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Ceará, em especial ao Raphael Oliveira e Andressa Almeida pela ajuda, troca de experiências, incentivo e companheirismo recebidos.

Ao colega Alexandre Casimiro pelo empenho e disponibilidade sempre que foi preciso.

Aos profissionais, agentes Comunitários de saúde, enfermeiros e auxiliares de laboratórios que atuaram nos municípios onde a pesquisa aconteceu, que sempre se dispuseram com simpatia em ajudar no processo da pesquisa.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para o sucesso deste trabalho e da minha vida.

## RESUMO

Hanseníase é uma doença infecciosa, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, que apresenta tropismo por células do sistema nervoso periférico, além de ocasionar lesões em pele. Dois desafios devem ser enfrentados em relação à hanseníase na atualidade: o diagnóstico tardio e a doença em crianças. O objetivo do presente trabalho foi investigar o papel dos anticorpos séricos anti-antígeno glicolípido- fenólico-I (anti-PGL-1) e sua associação como parâmetro auxiliar no diagnóstico de hanseníase. Foram incluídos no estudo dois municípios endêmicos (São Gonçalo do Amarante-CE e Rio Largo-AL) e dois municípios hiperendêmicos (Canindé-CE e Santana do Ipanema-AL). A partir do levantamento dos casos de hanseníase notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, Foram realizadas visitas domiciliares a 71 casos índices de qualquer idade e a 395 contatos intra e peridomiliares com idade entre 4 e 15 anos. Após avaliação dermatoneurológica de cada participante, foi realizada coleta de sangue. A dosagem sérica de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 foi realizada por ELISA indireto. Uma forte associação foi encontrada entre positividade de anticorpos e casos multibacilares. As *Odds ratios* (OR) foram de 6,11 (IC95% 3,08 - 12,16) para IgM, 3,31 (1,66 - 6,61) para IgG e 16,97 (IC95% 8,39 - 34,2) para IgA. Quando IgM foi associada a um ou mais isotipos, a OR foi de 21,0 (IC95% 10,11- 43,64), e quando IgG e IgA foram associadas, a OR foi de 17,58 (IC95% 6,23 - 49,54). A maior sensibilidade diagnóstica de 76,0% (IC95% 61,8- 86,9) foi observada para IgM e o menor valor encontrado foi de 24,1% (IC95% 13,0 - 38,2), o que foi observado para os isotipos IgG + IgA. Em relação aos valores preditivos positivos presumidos, o menor valor foi obtido para IgM, de 24,7% (IC95% 18,1 - 32,3), e os maiores valores foram observados para IgM associado a um ou mais isotipos, ou seja, de 60,0% (IC95% 44,3 - 74,3) e para os isotipos IgG + IgA, ou seja, de 66,7% (IC95% 41,0- 86,7), respectivamente. O presente trabalho sugere que na presença de dois ou mais isotipos de anticorpos, aumenta a probabilidade de estarmos diante de um caso de hanseníase.

**Palavras- Chave:** Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Anti-PGL-1; Imunoglobulinas.



## ABSTRACT

Hansen's disease (known as leprosy) is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*, which shows tropism for cells of the peripheral nervous system, and causes skin lesions. Nowadays, there are two challenges faced in relation to leprosy: late diagnosis and the disease in children. The aim of the present study is to investigate the role of anti-glycophenolic antigen-1 serum antibodies and their use as an auxiliary parameter in the diagnosis of leprosy. Two endemic municipalities (São Gonçalo do Amarante-CE and Rio Largo-AL) and 2 hyperendemic municipalities (Canindé-CE and Santana do Ipanema-AL) were included in the study. Home visits were made to 71 index cases ("any age"), and to 395 intra-household and peri-household contacts (between 4 and 15 years old). The survey of leprosy cases reported in the Notifiable Diseases Information System (SINAN) was used to carry out the visits. Each participant had blood collected after dermatoneurological evaluation. Serum dosage of anti-PGL-1 IgM, IgG and IgA was performed by indirect ELISA. A strong association was found between antibody positivity and multibacillary cases. The odds ratios (OR) were 6.11 (95%CI 3.08 - 12.16) for IgM, 3.31 (1.66 - 6.61) for IgG and 16.97 (95%CI 8.39 - 34.2) for IgA. When IgM was associated with one or more isotypes, the OR was 21.0 (95%CI 10.11-43.64), and when IgG and IgA were associated, the OR was 17.58 (95%CI 6.23 - 49.54). The highest diagnostic sensitivity of 76.0% (95%CI 61.8-86.9) was observed for IgM and the lowest value found was 24.1% (95%CI 13.0 - 38.2), which was observed for IgG + IgA isotypes. Regarding the presumed positive predictive values, the lowest value was obtained for IgM, of 24.7% (95%CI 18.1 - 32.3), and the highest values were observed for IgM associated with one or more isotypes, that is, 60.0% (95%CI 44.3 - 74.3) and for the IgG + IgA isotypes, that is, 66.7% (95%CI 41.0-86.7), respectively. The present work suggests that when two or more isotypes of antibodies are present, the probability of facing a case of leprosy increases.

**Keywords:** Leprosy; *Mycobacterium leprae*; Anti-PGL-1; Immunoglobulin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Níveis de anticorpos anti-PGL1 em casos de hanseníase multibacilar (MB) selecionados quando se encontravam em tratamento (0), ou entre aqueles tratados há 1 ano (1), ou naqueles tratados há 2 ou mais anos (2)  
..... 56
- Figura 2 - Níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos multibacilares (MB) saudáveis (CS; n = 251), contatos MB com lesões suspeitas (CL; n = 32) e casos índice de hanseníase MB (CI; n = 50)  
..... 58
- 8Figura 3 - Níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos paucibacilares (PB) saudáveis (CS; n = 89), contatos PB com lesões suspeitas (CL; n = 23) e casos índices de hanseníase PB (CI; n = 21)  
..... 59
- Figura 4 - Níveis de IgM, IgG e IgA em amostras de soro de contatos multibacilares (MB) intradomiciliares (CI, n = 6), contatos MB peridomiciliares (PD, n = 26) e casos índices de hanseníase MB (CI; n = 50)  
..... 60
- Figura 5 - Níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos paucibacilares (PB) intradomiciliares (ID, n= 14), contatos PB peridomiciliares (PD, n= 14) e casos índices de hanseníase PB (n = 21)  
..... 61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- População estimada por município em 2020, taxa de detecção de hanseníase em São Gonçalo do Amarante-CE, Canindé-CE, Rio Largo-AL, Santana do Ipanema-AL, de acordo com o ano em que foi realizada a coleta das amostras .....	43
Tabela 2	- Faixas etárias e formas clínicas dos casos índices selecionados para pesquisa a partir da notificação do SINAN (período de 5 anos), número estimado de contatos e cálculo amostral dos contatos.....	47
Tabela 3	- Classificação dos casos (n=71), segundo sexo, faixa etária e classificação operacional.....	53
Tabela 4	- Classificação dos contatos (n=395), segundo sexo, faixa etária, tipo de convivência, ou seja, intra domiciliares (PD)/peridomiciliares (PD), presença/ausência de lesões e forma clínica dos casos índices [multibacilar (MB)/paucibacilar (PB)] .....	55
Tabela 5	- Frequência de níveis positivos/negativos de anti-PGL-1 em casos índices de hanseníase paucibacilar e contatos saudáveis .....	63
Tabela 6	- Frequência de anti-PGL-1 positivos/negativos em casos índices com hanseníase multibacilar e contatos saudáveis.....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACS	Agente Comunitário de Saúde
APC	Célula apresentadora de antígenos
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette- Guérin
CL	Células de Langerhans
CS	Contatos Saudáveis
CI	Casos Índices
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático em fase sólida
FR	Fator Reumatoide
GIF	Grau de Incapacidade Física
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ID	Intradomiciliares
IL	Interleucina
LABIM	Laboratório de Imunologia
LS	Lesão Suspeita
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	Multibacilar
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
PB	Paucibacilar
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PD	Peridomiciliares
PGL-1	Glicolípido Fenólico 1
PQT	Poliquimioterapia
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
RPM	Rotações por minuto
SAGE	Sala de Apoio à Gestão Estratégica
SFB	Soro Fetal Bovino

SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TCD4	Linfócito T grupamento de diferenciação 4
TCD8	Linfócito T grupamento de diferenciação 8
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TLR	Receptor Toll-like
TLR2	Receptor Toll-like tipo 2

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>25</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>28</b>
4.1 Aspectos epidemiológicos na Hanseníase .....	28
4.2 Resposta imune na hanseníase.....	31
4.3 Diagnóstico Hanseníase.....	35
4.4 Papel da sorologia no seguimento de contatos .....	39
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>42</b>
5.1 Desenho do estudo.....	42
5.2 Aspectos Éticos .....	42
5.3 Locais selecionados para realização do estudo.....	43
5.3.1 São Gonçalo do Amarante – CE.....	43
5.3.2 Canindé – CE.....	44
5.3.3 Santana do Ipanema – AL .....	45
2.3.4 Rio Largo – AL .....	45
5.4 Casuística.....	46
5.4.1- Casos índices .....	48
5.4.2- Contatos.....	48
5.5 Avaliação Dermatoneurológica .....	48
5.6 Coleta de dados e de amostras biológicas .....	49
5.7 Determinação anticorpos séricos .....	50
5.8 Análise Estatística .....	52
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
6.1 Perfil clínico e demográfico de pessoas com hanseníase .....	53
6.2 Perfil clínico e demográfico de contatos intra e peridomiciliares de pessoas com hanseníase.....	54

6.3 Níveis de anticorpos séricos anti- PGL-1 nos cantatos e casos índices .....	57
6.4 Frequência de positividade de anticorpos anti-PGL-1 .....	62
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE A – INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS .....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO ...</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE C: TERMO DE ASSENTIMENTO PARA SUJEITOS DE 08 A 15 ANOS DE IDADE COMPLETOS .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E EMENDA .</b>	<b>97</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO 3: .....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, sendo realizado através da avaliação dermatoneurológica de lesões e/ou comprometimento de nervos periféricos (BRASIL, 2017). A hanseníase é a única patologia em que ocorre presença de lesões ou áreas com hipoestesia, sendo que a primeira sensibilidade a ser perdida é a térmica, a seguir, a dolorosa e por último, a tátil (BARRETO *et al.*, 2017; BRASIL, 2017).

Na infância, os sinais clínicos da hanseníase, muitas vezes, não são facilmente reconhecidos, além do fato da avaliação dermatoneurológica depender da percepção da criança em resposta aos testes. Quanto mais jovem a criança, mais difícil será a avaliação das lesões (ROMERO-MONTOYA *et al.*, 2014).

A hanseníase em criança é um indicador epidemiológico importante, pois reflete transmissão ativa da micobactéria no ambiente, evidenciando falhas nas estratégias de saúde pública (BARRETO *et al.*, 2014). A presença da doença em crianças indica que ela está convivendo com algum indivíduo bacilífero sem tratamento (SCHNEIDER; FREITAS, 2018). Além disso, a incidência da hanseníase entre jovens revela exposição precoce ao *Micobacterium leprae* (*M. leprae*), uma vez que o período de incubação da doença dura de 2 a 7 anos (SCHNEIDER; FREITAS, 2018).

A quebra da cadeia de transmissão da hanseníase depende da capacidade dos serviços de saúde em diagnosticar os casos na fase inicial da doença e em realizar adequadamente o tratamento (BRASIL, 2016). Entretanto, observa-se muitas vezes um despreparo dos profissionais da saúde na avaliação dos potenciais casos, o que dificulta o diagnóstico da doença. Dessa forma, muitos casos já se apresentam com algum grau de incapacidade física (GIF), o que mostra que está havendo diagnóstico tardio (LASTÓRIA; MACHARELLI; PUTINATTI, 2003). O GIF indica a existência de perda da sensibilidade protetora, força muscular e/ou deformidades visíveis em membros e outras partes do corpo (BRASIL, 2017).

No período de 2009 a 2020, foram diagnosticados no Brasil, 24.079 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos, com uma taxa de detecção de 3,44 por 100.000 habitantes em 2019, considerada alta (BRASIL, 2021a). No Ceará, de 2008 a 2019 foram diagnosticados 1.292 casos novos entre menores de 15 anos, sendo 14 diagnosticados em São Gonçalo do Amarante e 14 em Canindé (CEARÁ, 2020). Considerando uma série histórica de 10 anos (2010-2020) no estado de Alagoas, foram diagnosticados 242 casos novos entre menores de 15 anos de idade (BRASIL, 2020).



Destes, 2 foram diagnosticados no município de Rio Largo e 28, no município de Santana do Ipanema (ALAGOAS,2020).

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), 5,3% dos pacientes apresentaram incapacidade física Grau 2 (GIF 2) no momento do diagnóstico, no mundo (OMS, 2019). No Brasil, a proporção de casos de hanseníase com GIF 2 no momento do diagnóstico é de 9,9% (BRASIL,2021a), que reflete diagnóstico tardio (OMS, 2015; BRASIL, 2017). Além disso, o Brasil notificou 261 novos casos menores de 15 anos que foram diagnosticados com GIF 2 no período de 2015 a 2020 (OMS, 2021a). Tais dados demonstram que a “Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020”, cuja principal meta era a redução do GIF 2 entre os casos novos, não foi alcançada (OMS 2016). Dessa forma a OMS definiu novas metas com o objetivo de erradicar a hanseníase por meio da interrupção da transmissão (OMS,2021b) que está descrito na “Estratégia Global de Hanseníase 2021-2030”, esta por sua vez, tem como um dos principais objetivos a redução da taxa por milhão de habitantes de novos casos com GIF 2 em 90% e a redução da taxa por milhão de crianças de casos novos de hanseníase em crianças também em 90% (OMS,2021b).

Quanto ao uso de ferramentas laboratoriais, a realização de biópsia e de baciloscopia de raspado intradérmico são apenas auxiliares no diagnóstico. A baciloscopia de raspado intradérmico, onde se coleta material dos lóbulos das orelhas e dos cotovelos, com posterior coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen a frio, é uma técnica de baixa sensibilidade, resultando negativa, principalmente nas formas clínicas mais localizadas da doença, tais como nas formas paucibacilares (BRASIL, 2017).

Estudos mostram que aqueles que têm maior potencial de desenvolvimento da doença são os contatos muito próximos dos casos índices (SUZUKI *et al.*, 2012). Assim sendo, entende-se sobre a necessidade e a importância da avaliação dos indivíduos que apresentam um convívio social prolongado, como os que estudam em uma mesma escola e/ou que vivem em residências próximas, além daqueles que residem na mesma moradia que o caso índice (BARRETO *et al.*, 2014).

Nesse contexto surge a necessidade do desenvolvimento de um teste laboratorial que seja suficientemente sensível e específico para auxiliar o diagnóstico clínico da hanseníase, principalmente em indivíduos abaixo de 15 anos de idade, contato de casos índices.

Em setembro de 2021, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o uso do Kit-NAT HANS para hanseníase. (MENESES, 2021). Trata-se de um teste de

biologia molecular para ser empregado em biópsias de lesões cutâneas e de nervos, com objetivo de auxiliar o diagnóstico da hanseníase, quando a baciloscopia de raspado intradérmico for negativa (BRASIL, 2021b).

A sorologia, apesar de não ser utilizada na rotina, passou a ser bastante empregada em pesquisas em virtude da descoberta de uma molécula específica do *M. leprae*, o glicolípido fenólico 1, ou (PGL-1). O PGL-1 é uma molécula presente na parede celular de *M. leprae*, sendo que indivíduos que apresentaram algum contato com a bactéria podem desenvolver anticorpos específicos contra esse antígeno. Além disso, o PGL-1, seja em sua forma nativa ou semissintética, tem sido considerado um bom marcador de infecção (SPENCER; BRENNAN, 2011).

Embora anticorpos produzidos contra o PGL-1 não sejam capazes de diferenciar infecção de doença, acredita-se que existe uma associação entre soropositividade anti-PGL-1 e maior risco da ocorrência de casos de hanseníase (RIBEIRO *et al.*, 2021). Além disso, podem revelar ocorrência de endemicidade local (HENRY *et al.*, 2016).

Quanto aos testes para análise sorológica, têm sido empregados, a técnica imunoenzimática em fase sólida (ELISA) tipo indireto, e testes de imunocromatografia (NIITSUMA *et al.*, 2021). Os testes de imunocromatografia apresentam vantagens do ponto de vista técnico, frente ao ELISA, pois são rapidamente executáveis, e dispensam equipamentos, no entanto, não são capazes de quantificar anticorpos em amostras (CABRAL *et al.*, 2013). Os testes de ELISA podem ser empregados como testes semi-quantitativos o que possibilita a avaliação dos níveis de anti PGL-1 em estudos de seguimento de contatos.

Em relação aos isotipos analisados, IgM tem sido o único isotipo pesquisado em amostras de soro de pacientes e contatos (BARRETO *et al.*, 2011), com base no fato de que PGL-1 ser um antígeno T-independente e induzir basicamente a produção de IgM (SPENCER E BRENNAN, 2011).

Embora o teste para IgG anti-PGL-1 sérico apresente uma alta especificidade diagnóstica (CABRAL *et al.*, 2013), ele possui baixa sensibilidade diagnóstica (NAGAO-DIAS *et al.*, 2007). São poucos os relatos referentes ao isotipo IgA sérico anti PGL-1 (SCHWERER *et al.*, 1989, CHUJOR *et al.*, 1991). Recentemente, o nosso grupo mostrou que a IgA apresenta um melhor desempenho em comparação com o isotipo IgG. IgG apresentou uma correlação moderada com IgM ( $r= 0,479$ ,  $p = 0,0055$ ) e uma sensibilidade diagnóstica muito baixa mesmo em pacientes com a forma multibacilar. Por outro lado, a IgA apresentou forte correlação com IgM ( $r= 0,745$ ,  $p <0,0001$ )

(MACEDO., et al 2017). Ainda assim, um trabalho realizado por nosso grupo demonstrou em um estudo prospectivo de três anos, uma associação de risco entre a presença de IgG anti-PGL-1 e hanseníase (NAGAO-DIAS *et al.*, 2019).

A importância da IgA para a imunidade das mucosas está bem estabelecida (LAMM,1988; MANTIS *et al.*, 2011). Entretanto, o conhecimento sobre seu papel protetor na circulação sistêmica ainda é debatido (BLUTT *et al.*, 2012). Nos últimos anos, tem sido proposto seu uso no diagnóstico de algumas doenças infecciosas, como leptospirose (SILVA *et al.*, 1992), toxoplasmose (TAKAHASHI; ROSSI, 1994) e dengue (TALARMIN *et al.*, 1998; NAWA *et al.*, 2005; DE DECKER *et al.*, 2015). O isotipo IgA apresenta uma vantagem em comparação com os isotipos IgM e IgG, pois aparece precocemente na infecção e desaparece muito mais rápido que os isotipos IgM e IgG (DE DECKER *et al.*, 2015).

Com base no exposto acima, o objetivo da presente pesquisa é avaliar a contribuição dos principais isotipos de anticorpos séricos produzidos contra o antígeno PGL-1 de *M. leprae* em contatos menores de 15 anos de idade e nos casos índices, bem como avaliar a associação de cada um dos isotipos com a hanseníase.

## 2 JUSTIFICATIVA

Um dos maiores desafios enfrentados na atualidade no que diz respeito à hanseníase é o diagnóstico precoce da doença, quando as manifestações clínicas são discretas. O diagnóstico precoce é importante para o controle da hanseníase, entretanto, há diversos fatores que o dificultam, tais como o longo período de incubação do bacilo, o início da doença com sinais e sintomas inespecíficos, e o pouco conhecimento de profissionais da saúde quanto ao diagnóstico e ao manejo terapêutico (STAFIN; GUEDES; MENDES, 2018).

A detecção de casos entre jovens abaixo de 15 anos de idade é uma demonstração evidente de que a doença está longe de ser controlada. A avaliação dermatoneurológica em crianças é bastante difícil de ser realizada pois, depende de sua percepção para responder aos testes e do conhecimento técnico do profissional de saúde. Dessa forma, se não houver diagnóstico de forma precoce, a doença pode evoluir para formas mais disseminadas podendo haver comprometimento neurológico e incapacidades físicas irreversíveis. A hanseníase na infância produz efeitos psicológicos, físicos e sociais negativos que podem se estender e afetar de forma permanente a vida das crianças por ela acometidas.

Assim, é de fundamental importância buscar testes laboratoriais que possam auxiliar no diagnóstico clínico da hanseníase em crianças com manifestações clínicas ainda discretas e sem incapacidades físicas. Nesse contexto, o presente estudo visa avaliar o potencial dos marcadores sorológicos como ferramentas de diagnóstico da doença.

Dado o fato de que o PGL-1 é específico de *M. leprae* e que indivíduos que residem próximo ou dentro da moradia do caso índice podem vir a produzir anticorpos contra essa molécula, nos últimos anos, pesquisadores vêm intensificando estudos sobre sua aplicação na vigilância de contatos, principalmente em áreas endêmicas (BARRETO *et al.*, 2014; BARRETO *et al.*, 2015).

Nosso grupo de pesquisa tem investigado o papel dos principais isotipos de anticorpos salivares e séricos anti-antígeno PGL-1. Em um estudo prospectivo de três anos entre crianças de 4 a 15 anos de idade, foi possível demonstrar um risco maior de doença entre aqueles com positividade para IgG anti-PGL-1 (NAGAO-DIAS *et al.*, 2019; ANEXO 2). Em trabalho anterior, havia sido demonstrado que o isotipo IgA possui uma boa correlação com IgM (MACEDO *et al.*, 2017). Tais estudos foram

inicialmente realizados em municípios de Alagoas e se tornou base para o segundo projeto, que foi estendido para dois municípios do Ceará.

Dessa forma, o presente estudo, utiliza a ferramenta da sorologia associada à avaliação dermatoneurológica e visa em um estudo transversal avaliar a real contribuição dos principais isotipos de anticorpos séricos produzidos contra o antígeno PGL-1 de *M. leprae* e sua associação com a hanseníase.

### **3 OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral**

Investigar o papel dos anticorpos séricos anti-antígeno glicolípido-fenólico-1 (PGL-1) como parâmetro auxiliar no diagnóstico de hanseníase.

#### **Objetivos específicos**

- Determinar o perfil clínico e demográfico de casos índices com hanseníase notificados no Sistema de Informes de Agravos de Notificação no período de 2013-2018 em quatro municípios endêmicos e hiperendêmicos do Nordeste;
- Descrever o perfil clínico e demográfico de contatos intradomiciliares e peridomiciliares dos casos índices na faixa etária de 4 a 15 anos de idade;
- Mensurar os níveis de anticorpos séricos anti- PGL-1 nos contatos e casos índices;
- Identificar a proporção de casos suspeitos de hanseníase em contatos menores de 15 anos de idade;
- Averiguar associação da frequência de positividade de anticorpos séricos entre contatos com e sem suspeição de hanseníase;
- Analisar associação da frequência de positividade de anticorpos séricos entre contatos sem lesões e casos de hanseníase;

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 Aspectos epidemiológicos na Hanseníase

O termo hanseníase é uma homenagem ao médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, que identificou o bacilo *M. leprae* como sendo a causa da doença em 1873 (EIDT, 2004). A análise de DNA de cepas de *M. leprae* sugere que esta bactéria que causa a hanseníase se originou no leste da África e se espalhou para a Ásia, Meio Oeste, Europa e para países da África Central, através do comércio de escravos. Nas Américas, parece mais provável que a doença tenha sido trazida por imigrantes europeus (MONOT *et al.*, 2009). Os primeiros casos foram notificados no Brasil em 1600 na cidade do Rio de Janeiro. Depois disso, a doença se espalhou para as demais regiões brasileiras (EIDT, 2004).

A prevalência da hanseníase diminuiu acentuadamente desde a introdução da poliquioterapia (PQT) no início da década de 1980. Muito anterior à introdução da PQT como tratamento para a doença, a principal estratégia empregada para prevenir a disseminação da hanseníase era o isolamento obrigatório de pacientes em colônias estabelecidas no Brasil a partir de 1923. O isolamento dos pacientes deixou de ser obrigatório com a introdução do fármaco dapsona na década de 1940. Devido ao aparecimento de casos de resistência à monoterapia com dapsona em 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS), a partir de 1982, sugeriu o uso de regimes de PQT, que vem sendo utilizada até hoje (OMS, 1982) A PQT foi oficialmente implementada no Brasil em 1993 (CAVALIERE; COSTA 2011; CUNHA 2010).

A hanseníase é endêmica em países tropicais, especialmente, em países subdesenvolvidos. No mundo, foram reportados à OMS, 202.185 casos novos de hanseníase em 2019. Desses, 29.936 ocorreram na região das Américas e aproximadamente 93% do total foram notificados no Brasil (BRASIL, 2021). Desde 1991, a OMS tem como meta a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública, buscando a redução da notificação de novos casos para menos de 10 casos por 100 mil habitantes (OMS, 2016-2020). O Brasil ainda não atingiu tal meta, e ocupa o segundo lugar em termos de número absoluto de casos, após a Índia (OMS, 2021).

Em 2019, o Brasil apresentou uma taxa de detecção de 13,23 casos novos para cada 100 mil habitantes, com 27.864 casos novos, dos quais aproximadamente 80% eram casos multibacilares (MB). Apesar da taxa de detecção estar diminuindo em comparação com anos anteriores, o Brasil continua sendo um país de alta endemicidade

para doença. Além disso, observou-se um aumento de 32,6% de casos novos MB no período de 2010 até 2019 (BRASIL, 2021).

A doença disseminou-se de forma desigual pelas diferentes regiões do país e as maiores taxas de detecção geral de casos novos foram encontradas no Centro-Oeste (39,93 casos por 100.000 habitantes), Norte (28,63 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (19,97 casos por 100.000 habitantes) (BRASIL, 2021). No período de 2015 a 2019, foram notificados 8.378 casos novos da doença no estado do Ceará, tendo havido redução de 16,9% na taxa de detecção geral de hanseníase passando, de 20,7 casos novos por 100 mil habitantes para 17,2 por 100 mil habitantes. Em 2019, a taxa de detecção de casos novos nos municípios de São Gonçalo do Amarante e de Canindé foram de 8,26 e 41,6 casos novos por 100.000 habitantes, respectivamente (CEARÁ, 2021). Os dois municípios são considerados endêmicos para hanseníase, sendo Canindé classificado como hiperendêmico para a doença, segundo parâmetros do Ministério da Saúde. Enquanto o estado de Alagoas apresentou uma taxa de detecção de casos novos em 2019 correspondente a 8,28 por 100.000 habitantes, os municípios de Rio Largo e Santana do Ipanema, notificaram 3,97 e 25,0 por 100.000 habitantes, respectivamente (ALAGOAS, 2020).

Embora venha sendo observada uma diminuição progressiva nos registros da incidência da doença, esses dados parecem não condizerem com a realidade. As regiões Norte e Nordeste permanecem com alta endemia de hanseníase, sendo os contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase a população de maior risco para o desenvolvimento da doença (ROMANHOLO *et al.*, 2018). Não é suficiente a notificação de casos novos para se compreender a gravidade da situação epidemiológica da hanseníase. Dois outros fatores indicam que a doença está longe de ser controlada: 1) taxa de detecção de casos novos em crianças menores de 15 anos de idade e 2) casos diagnosticados com incapacidade física grau 2.

No período de 2009 a 2020, foram diagnosticados no Brasil 24.079 casos novos de hanseníase em menores de 15 anos de idade, com uma taxa de detecção de 3,44 por 100 mil habitantes em 2019, considerada alta (BRASIL, 2021). No Ceará, de 2008 a 2019 foram diagnosticados 1.292 casos novos entre menores de 15 anos, sendo 14 diagnosticados em São Gonçalo do Amarante e 14 em Canindé (CEARÁ, 2020). Em uma série histórica de 10 anos (2010-2020) no estado de Alagoas, foram diagnosticados 242 novos casos entre menores de 15 anos (BRASIL, 2020). Destes, dois foram diagnosticados no município de Rio Largo e 28 no município de Santana do Ipanema



(ALAGOAS,2020). O diagnóstico de hanseníase em crianças reflete transmissão ativa da bactéria, o que evidencia falhas nas estratégias de saúde pública (BARRETO *et al.*, 2014).

Dessa forma, a redução dos casos de hanseníase em crianças menores de 15 anos de idade tornou-se uma prioridade no Brasil (BRASIL, 2021). A realização de uma avaliação cuidadosa dos contatos principalmente daqueles que residem no mesmo domicílio do caso índice é uma das estratégias que não têm sido cumpridas a contento.

À medida que ocorre a progressão da hanseníase não tratada, pode levar a danos em nervos periféricos, resultando em redução funcional de membros superiores e inferiores, além de outros órgãos, que levam ao grau 2 de incapacidade física (GOMÉZ *et al.*, 2018).

O grau de incapacidade física (GIF) indica a existência de perda da sensibilidade protetora, força muscular e/ou deformidades visíveis na face, membros superiores e inferiores, com graduação que varia entre 0, 1 e 2. No grau 0 ocorre ausência de incapacidade funcional, no grau 1, observa-se a perda da sensibilidade dolorosa e no grau 2, observa-se deformidades caracterizadas por dedos em garra, membros caídos, reabsorção óssea, entre outros. O GIF é um indicador epidemiológico que pode ser utilizado na avaliação do programa de vigilância de hanseníase, sendo uma maneira de investigar a precocidade do diagnóstico e o sucesso das atividades que visam a interrupção da cadeia de transmissão (BRASIL, 2017). GIF 2 é um marcador mais robusto para o mapeamento de casos de hanseníase por país, sendo que novos casos de GIF 2 é um indicador de diagnóstico tardio da hanseníase (ALBERTS *et al.*,2011; OMS, 2015; BRASIL, 2017).

Embora GIF 2 no momento do diagnóstico seja um forte indicador de diagnóstico tardio, a identificação das formas polares, principalmente as formas multibacilares da doença, é claramente representativa de diagnóstico tardio, uma vez que as manifestações clínicas tardam em média 5 anos para ocorrerem, sendo que a primeira forma a ser visualizada é a forma indeterminada (SCHNEIDER; FREITAS, 2018). Existe a necessidade portanto, de uma definição robusta e uniforme do que significa diagnóstico tardio bem como diagnóstico precoce na hanseníase, uma vez que referências sobre o assunto são escassas na literatura acadêmica e oficial.

No período de 2009 a 2018, foram diagnosticados no Brasil, 85.217 casos novos de hanseníase com incapacidade graus 1 e 2, sendo que nos casos com grau 2 de deficiência, 92,7% dos casos eram MB. No mesmo período, o estado do Ceará

apresentou 1.610 casos que foram diagnosticados com incapacidade graus 1 e 2 (BRASIL 2020).

Em 2019, a taxa de detecção de casos novos com deficiência de grau 2 no Brasil foi de 11,16 por 1 milhão de habitantes, sendo que no Ceará, essa taxa foi 14,86 por 1 milhão de habitantes e em Alagoas foi de 5,28 por 1 milhão de habitantes (BRASIL 2021).

Segundo dados da OMS dos anos de 2015 a 2020, foram diagnosticadas 261 crianças até 15 anos de idade com grau 2 de incapacidade no Brasil (OMS, 2021).

Para que haja interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase é importante que ocorra detecção precoce e tratamento imediato do paciente. Entretanto, como se trata de uma doença onde o diagnóstico é essencialmente clínico, o desconhecimento da população sobre a doença em algumas regiões é um fator agravante.

#### 4.2 Resposta imune na hanseníase

*M. leprae* é um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), sua parede celular possui cerca de 20 nm de espessura, sendo constituída, principalmente, de lipídeos, em particular, os ácidos micólicos e os glicolipídeos fenólicos (BÜHRER-SÉKULA, 2008).

O PGL-1 é o principal antígeno do *M. leprae*. O mesmo é composto por um único trissacarídeo, o 3,6-di-O-metila- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-2,3-di-O-metila- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-3-O-metila- $\alpha$ -L-ramnopiranosose. A região de di- e trissacarídeo da molécula é a principal responsável pela atividade antigênica do PGL-1 (SPENCER; BRENNAN, 2011) e a porção terminal 3,6 – di-O-metil-glucose é a chave para a alta especificidade da resposta humoral ao *M. leprae* (MADEIRA, 2000).

Foi descrito que o PGL-1 também pode reagir com compostos de radicais livres, protegendo o bacilo dos efeitos tóxicos de enzimas lisossomais e metabólitos oxidativos produzidos por macrófagos durante a resposta imunológica (MACIEIRA, 2000).

O homem é reconhecido como único hospedeiro do *M. leprae*, embora tenham sido identificados animais naturalmente infectados. Os tatus (*Dasypus novemcinctus*) são reconhecidos hospedeiros naturais do *M. leprae*, tendo-se a hipótese de que poderiam causar hanseníase zoonótica, através da caça do animal ou manipulação de locais onde o animal habita (SILVA *et al.*, 2018). Estudos de biologia molecular apontam para a permanência da bactéria no meio ambiente, por exemplo, na água e no solo, o que levanta a questão se seriam outras fontes alternativas de transmissão do patógeno. De qualquer forma, a principal fonte de transmissão do *M. leprae* é através de

contato prolongado com pacientes MB não tratados através de perdigotos expelidos na fala, tosse ou espirro (VALOIS; CAMPOS; IGNOTTI, 2015).

*M. leprae* é um patógeno intravesicular que pode sobreviver no interior de fagolisossomas de monócitos, macrófagos, células dendríticas, e apresenta tropismo por células de Schwann. O bacilo não é cultivável e apresenta replicação lenta (GOULART *et al.*, 2002). Com a microbiologia molecular, tornou-se possível explicar, por exemplo, a natureza fastidiosa do *M. leprae* e sua predileção pelo ambiente intracelular (SCOLLARD *et al.*, 2006).

A hanseníase é uma doença que afeta, predominantemente, a pele e nervos periféricos (GOULART *et al.*, 2002). A localização das lesões causadas pelo *M. leprae* em pacientes com hanseníase sugere que a bactéria tem predileção por temperaturas abaixo de 37° C (MACIEIRA, 2000).

A primeira linha de defesa contra patógenos ou agentes externos ocorre através da resposta imune inata, constituída por barreiras mecânicas, fisiológicas, fatores solúveis e células. A interação entre células e microrganismos pode ocorrer através de receptores de reconhecimento de patógenos (PRR) nas células e estruturas dos microrganismos, denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Além de tais interações, microrganismos opsonizados por moléculas do sistema imune, como proteínas do Complemento, proteína C reativa, lectina ligante de manose podem se ligar a receptores em fagócitos e serem mais facilmente endocitados (NATH *et al.*, 2015).

Um dos mecanismos de entrada do bacilo em macrófagos é através do PGL-1 que interage com a proteína C3b do sistema complemento, sendo reconhecido pelo receptor do complemento CR1, e com a proteína C3bi, que se liga à CR3 e CR4, havendo indução de sua fagocitose. Quando a interação ocorre através do microrganismo opsonizado por fatores de Complemento e seus receptores em fagócitos, observa-se uma ativação alternativa de macrófago, que passa a atuar como M-2 (perfil anérgico). Neste caso, o macrófago adquire um perfil anti-inflamatório (FROES *et al.*, 2020).

Neste sentido, observa-se um papel fundamental do antígeno PGL-1, que parece ser um dos componentes centrais para a patogênese da hanseníase, estando envolvido no mecanismo de escape do fagolisossomo dentro do monócito/macrófago. O microrganismo no interior dos fagolisossomas, em ambiente favorável, produz PGL-1 em excesso. Este desempenha uma função imunossupressora, induzindo baixa produção

de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de moléculas regulatórias, o que facilita a sobrevivência do bacilo na célula e sua disseminação (FROES *et al.*, 2020).

Os macrófagos são categorizados em dois tipos, o tipo M-1 e o tipo M-2. Macrófagos com fenótipo inflamatório M-1 encontram-se presentes em granulomas de pacientes com hanseníase tuberculóide. Por outro lado, achados histopatológicos de pacientes com hanseníase virchowiana exibem macrófagos M-2 com aspecto espumoso. O aspecto espumoso é decorrente das células estarem com citoplasma rico em lipídios (presença exacerbada de PGL-1), que não se coram com os corantes comumente utilizados para coloração de tecidos (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Os mecanismos de diferenciação dos macrófagos parecem estar relacionados com a forma com que tais células interagem com as micobactérias. A presença de determinadas citocinas no microambiente também influencia na polarização dos macrófagos para fenótipo M-1 ou M-2 (KIBBIE *et al.*, 2016).

Quando o *M. leprae* interage através de antígenos da parede da micobactéria com receptores do tipo Toll (TLRs) 2 e 4, os macrófagos adquirem o perfil M-1 e, dessa forma, produzem interleucina (IL) 12, uma das principais citocinas que promovem a diferenciação do perfil T *helper* 0 em perfil T *helper* 1 (Th1) da imunidade adaptativa. Polimorfismos em genes que codificam os TLRs podem levar à não diferenciação do macrófago para M1 (KANG *et al.*, 2012; FROES *et al.*, 2020).

Além dos macrófagos, células dendríticas também são células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), cuja função é de processar e apresentar antígenos para linfócitos T. As células de Langerhans (CL) são tipos de células dendríticas localizadas na epiderme e na derme que expressam moléculas ligantes de lipídios, CD1a e CD207. O fato de se ter encontrado maior número de CLs na epiderme de lesões de hanseníase tuberculóide do que em lesões de hanseníase virchowiana parece indicar que a presença de células dendríticas está correlacionada com resposta imune celular contra *M. leprae* (HIRAI *et al.*, 2015).

As células de Schwann são células que produzem bainha de mielina no sistema nervoso periférico e são desprovidas de enzimas e outras moléculas capazes de eliminar as micobactérias em seu interior. *M. leprae* possui tropismo por essas células, devido à sua capacidade de se ligar à laminina-2 da membrana basal das mesmas. Quando infectadas, as células de Schwann conseguem de alguma forma expressar moléculas co-estimulatórias e terminam por apresentar antígenos para linfócitos T. Tal mecanismo

favorece ainda mais a destruição dessas células, e consequente desmielinização dos nervos (SPIERINGS *et al.*, 2001).

O processo de apresentação dos antígenos via MHC classe II para linfócitos T CD4<sup>+</sup> ocorre geralmente no interior dos linfonodos regionais. Nessas localidades, os linfócitos encontram-se em repouso (Th0) e tornam-se ativados por moléculas secretadas pelas APCs ativadas. A depender das citocinas liberadas pelas APCs, os linfócitos podem se diferenciar em distintas subpopulações de linfócitos T (DE SOUZA *et al.*, 2015). São elas: i) T *helper* 1 (Th1), que secreta interleucina-2 (IL-2), interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fundamental na ativação de macrófagos, fator de necrose tumoral (TNF), importante na formação e manutenção do granuloma; (ii) células T *helper* 2 (Th2), que secreta interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5) e interleucina-13 (IL-13) que estimulam a produção de anticorpos e ativam alternativamente os macrófagos; (iii) células T *helper* 17 (Th17) que produzem interleucina-17 (IL-17) e interleucina-22 (IL-22) e estão envolvidas na resposta inflamatória causada por bactérias e em doenças autoimunes; (iiii) células T reguladoras, subconjunto de (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup>), que produz interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), envolvidos com perfil anti-inflamatório e de fibrose tecidual (HARRINGTON *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2013).

O paradigma Th1/ Th2 pode explicar as manifestações e histopatologia das duas formas polares da hanseníase. Na forma tuberculóide, a resposta imune mediada por células predomina e os bacilos raramente são observados, enquanto na forma lepromatosa, considerada a forma disseminada, a resposta imune humoral predomina, sendo a carga bacilar é alta (MI *et al.*, 2020). Como resultado desse paradigma, o perfil de citocinas encontrado em cada polo da hanseníase difere completamente.

Assim como as células Th1, a subpopulação Th17 produz citocinas pro-inflamatórias como por exemplo a IL-17. Essa citocina foi encontrada em pacientes com hanseníase tuberculóide e, principalmente em pacientes com reações de hipersensibilidade do tipo IV na hanseníase. Tal perfil está relacionado com maior recrutamento de células inflamatórias, ativação de células endoteliais e células que mantém o estado inflamatório crônico por IL-17. A IL-17 pode induzir a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e iNOS, levando à geração de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, as células Th17 estariam relacionadas com a modulação da atividade de macrófagos contribuindo para eliminação do bacilo (ATTIA *et al.*, 2014; AARÃO *et al.*; 2016).

As células Th0 se diferenciam em células T reguladoras (Tregs) na presença de altos níveis de TGF- $\beta$  e IL-10. Tregs apresentam funções de tolerância e imunossupressão e sua função é de manutenção de tolerância periférica, sendo essenciais na prevenção de doenças autoimunes, por exemplo (CHEN; OPPENHEIM 2014). Em doenças infecciosas, tais como na hanseníase, tal perfil de linfócitos é altamente desfavorável à indução de resposta imune celular e, com isso, contribui favoravelmente com a forma disseminada da doença, isto é, com a forma virchowiana da hanseníase (PALERMO et al,2012).

Além disso os pesquisadores demonstraram um papel importante das subpopulações de células Th9 e Th22 relacionado com os diferentes espectros na hanseníase (DE LIMA *et al.*, 2014; DE SOUSA *et al.*, 2017). Segundo DE LIMA e colaboradores (2014), a liberação de IL-22 na hanseníase virchowiana, pode ser uma tentativa de estimular a atividade microbicida de macrófagos que é comprometida por mecanismos de escape do sistema imune pelo *M. leprae* (DE LIMA *et al.*, 2014).

A imunidade humoral é ineficaz para eliminação de patógenos como o *M. leprae*, uma vez que o bacilo pode se multiplicar e sobreviver no interior de células de pacientes com hanseníase virchowiana (MONTROYA *et al.*, 2019).

### 4.3 Diagnóstico Hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, sendo realizado através de exame dermatoneurológico para identificar lesões com alteração de sensibilidade e comprometimento de nervos periféricos. A análise clínica de lesões cutâneas e de danos aos nervos deve ser realizada por um profissional de saúde experiente em hanseníase. Deve-se também avaliar a história epidemiológica do paciente, levando em conta, condições locais sanitárias e convivência com casos diagnosticados, uma vez que o paciente pode residir em áreas endêmicas para doença (BRASIL, 2010).

Segundo a OMS, um caso de hanseníase é confirmado quando se identifica: 1) lesão(es) com alteração de sensibilidade térmica, dolorosa e/ou tátil; 2) acometimento neural com espessamento, ocorrendo ou não alterações sensitivas, motoras ou autonômicas e 3) baciloscopia positiva de raspado intradérmico ou em biópsia da lesão (OMS, 2019). É importante ressaltar que não se pode descartar diagnóstico de hanseníase, quando a baciloscopia é negativa, fato que frequentemente ocorre nas formas paucibacilares da doença (LYON; LYON-MOREIRA, 2013).

O exame físico deve ser realizado em local com boa iluminação, se possível, luz natural, avaliando-se toda a superfície corpórea (RODRIGUES *et al*, 2012). Deve-se buscar por lesões hipocrômicas, avermelhadas ou acastanhadas, testando-se a sensibilidade térmica, dolorosa e tátil nas lesões. Deve-se também verificar nas lesões a ocorrência de alopecia e anidrose. As lesões da hanseníase são bastante variáveis e dependem da forma como a doença se apresenta no paciente, portanto, é comum aparecer presença de pápulas, nódulos e infiltração principalmente na face e pavilhões auriculares (BRASIL, 2017).

Os nervos frequentemente acometidos pela doença devem ser examinados através de palpação, sendo eles, nervos fibular comum, tibial posterior, ulnar, radial, mediano, auricular, facial, trigêmeo (BRASIL, 2017). Deve-se verificar existência de dor, espessamento, simetria, e observar diminuição e/ou perda de funcionalidade dos nervos afetados, principalmente nos olhos, nas mãos e pés. É recomendado realizar testes de força muscular para verificar presença de acometimento neurológico, principalmente nos membros superiores e inferiores e nas pálpebras (RODRIGUES *et al*, 2012; BRASIL, 2017). Observa-se também se há edema nas mãos e pés, xerose, febre, artralgias, comprometimento da mucosa nasal, ressecamento e sensação de areia nos olhos (BRASIL, 2017).

Os testes de sensibilidade devem ser iniciados por buscas de alterações na sensibilidade térmica pois, é a primeira que se perde na hanseníase. Esse teste consiste em tocar a lesão ou uma região íntegra do indivíduo com tubos de ensaio contendo água fria (temperatura aproximada de 25°C) e quente (temperatura aproximada de 45 °C). Não havendo a possibilidade de se realizar o teste com tubos de ensaio, pode-se utilizar algodão embebido em álcool, que corresponderá à sensação de frio, e algodão seco (RODRIGUES; GRESTA, 2013; BRASIL, 2017).

Lesões cutâneas com hipoestesia são geralmente sinal característico da hanseníase e contribuem para o diagnóstico diferencial pois, nenhuma outra condição dermatológica está associada com distúrbios sensoriais (FLAGEUL, 2011).

A segunda alteração da sensibilidade a ser avaliada é a sensibilidade dolorosa na qual a pele do paciente é estimulada com a ponta ou o fundo da agulha estéril e descartável. Por último, deve-se avaliar a sensibilidade tátil, tocando as lesões com um chumaço de algodão seco e solicitando ao paciente que indique a área tocada (BRASIL, 2017). Outra maneira de se avaliar a alteração da sensibilidade tátil é utilizando os monofilamentos de Semmes-Weinstein (estesiômetro), que exercem sobre a pele pesos

referentes a gramaturas distintas identificadas por cores (RODRIGUES; GRESTA., 2013). O estesiômetro é composto por seis monofilamentos, que exercem sobre a pele pesos equivalentes a 0,07 gramas (verde); 0,2 gramas (azul); 2 gramas (violeta); 4 gramas (vermelho escuro); 10 gramas (laranja) e 300 gramas (vermelho magenta). O primeiro monofilamento a ser testado é o de menor calibre (0,07g; verde), que corresponde à sensibilidade tátil normal, excetuando na região plantar onde o padrão de normalidade considerado é o monofilamento de 0,2 gramas (azul) (BRASIL, 2017).

Durante a avaliação da pele, também é possível realizar o teste do iodo amido e teste da histamina endógena, na qual se passa a tampa da caneta sobre a área com lesão e espera-se o aparecimento de um eritema. Caso haja ausência de rubor causada pela liberação de histamina e a ausência de sudorese observado respectivamente nos testes anteriores, as lesões possuem características de hanseníase (BRASIL, 2017).

O diagnóstico clínico das formas paucibacilares (PB) pode ser um desafio (OMS 2019). Na forma indeterminada, a lesão de pele geralmente é única, hipocrômica e sem relevo, apresenta bordas mal delimitadas, e seca. Há perda ou alteração de sensibilidade térmica e/ou dolorosa, mas a tátil geralmente é preservada. Exames laboratoriais são inconclusivos ou negativos nesses casos, portanto não se deve descartar hanseníase com resultados desse tipo (BRASIL, 2017).

Na hanseníase tuberculóide, a manifestação que mais aparece é em forma de placa anestesiada, com bordas elevadas e bem delimitadas. Pode apresentar um único nervo espessado com perda de sensibilidade. Nessa forma da doença, o diagnóstico é essencialmente clínico pois a baciloscopia e a biópsia da lesão são negativas e, portanto, não confirmam sozinhos o diagnóstico (BRASIL, 2017).

Nas formas dimorfas da doença o paciente apresenta várias lesões que podem ser vermelhas ou hipocrômicas e com bordas em alto relevo. As lesões podem ser hipoestésicas ou anestésicas e, nessa forma, o comprometimento neural é significativo, atingindo mais de um tronco nervoso com padrão assimétrico (SOUZA, 1997; LYON, 2013). A baciloscopia da borda infiltrada das lesões quando bem coletada e corada, é frequentemente positiva (BRASIL, 2017).

A hanseníase virchowiana é caracterizada pela presença de infiltração difusa da pele com bordas indistintas. A pele apresenta-se avermelhada, seca, infiltrada, cujos poros apresentam-se dilatados. A perda das sobrancelhas, geralmente começando na parte externa das sobrancelhas, dá o aspecto típico conhecido como madarose. A perda de cílios também é observada nesses pacientes (BRASIL, 2017). A infiltração



progressiva da face torna as dobras cutâneas mais evidentes dando um aspecto clínico típico conhecido como *facies leonina*. À medida que a doença progride, pode haver espessamento de nervos periféricos e a sensibilidade alterada pode ocorrer nas mãos, pés e outras áreas envolvidas. As incapacidades podem ocorrer como consequência desse processo (TALHARI *et al.*, 2015). Nessa forma de doença, o diagnóstico pode ser confirmado pela baciloscopia dos lóbulos das orelhas e cotovelos (BRASIL, 2017).

Para quebrar a cadeia de transmissão da hanseníase e controlar a doença, se faz necessário realizar diagnóstico precoce dos casos (ALENCAR *et al.*, 2012). Além disso, deve-se realizar avaliação dermatoneurológica e seguimento dos contatos anualmente por um período de cinco anos (BRASIL, 2017).

Em crianças, a dificuldade de aplicação e interpretação dos testes de sensibilidade torna-se mais evidente (LYON; GROSSI, 2014; ALVES, 2014). Diante de um caso suspeito de hanseníase em menores de 15 anos de idade, deve-se preencher o Protocolo Complementar de Investigação Diagnóstica de Casos de Hanseníase em Menores de 15 Anos (PCID<15) (BRASIL, 2017).

O diagnóstico laboratorial na hanseníase deve ser realizado sempre que possível para apoiar o diagnóstico clínico. Quando disponíveis, os exames complementares (baciloscopia de raspado intradérmico e biópsia de pele) devem ser realizados.

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), para a baciloscopia de raspado intradérmico, realiza-se coleta de esfregaços intradérmicos em quatro locais, cotovelo (2) e lóbulos auriculares (2) e, se possível, uma coleta de raspado da lesão (1) e, após, cora-se pela técnica de Ziehl -Neelsen. Em seguida, pesquisa-se por bacilos álcool- ácido resistentes, utilizando-se o microscópio óptico para sua visualização. A expressão dos resultados é dada em índices baciloscópicos, em uma escala que varia de 0 a 6+.

A baciloscopia de raspado intradérmico é utilizada para auxiliar o diagnóstico e, também, na classificação das formas da hanseníase. Ela apresenta-se negativa nas formas indeterminada, tuberculóide; positiva na forma virchowiana e variáveis nas formas dimorfas (SARUBI; MARCELLO, 2013).

Outro exame que pode ser útil no diagnóstico da hanseníase é o exame histopatológico das lesões cutâneas. Ele é realizado através de coloração com hematoxilina-eosina e Faraco-Fite, que evidencia bacilos álcool-ácido-resistentes em biópsias de lesões cutâneas (preferencialmente das margens das lesões, incluindo tecido subcutâneo). Dependendo da apresentação clínica, o espectro histopatológico da

hanseníase é extremamente diverso. Dessa forma, o diagnóstico deve sempre levar em conta a correlação clínico-patológica (FISCHER, 2017).

A análise do DNA de *M. leprae* pode ser realizada através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em setembro de 2021, foi aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA, o Kit-NAT HANS, teste molecular para ser realizado em biópsia de lesão de hanseníase (BRASIL 2021b). A empregabilidade do kit é em indivíduos com lesão ou alteração no nervo de forma associada à baciloscopia de raspado intradérmica.

O uso de testes sorológicos continua sendo um desafio pois não diferencia contatos e pacientes com hanseníase, assim como estão presentes nas formas multibacilares da doença e com menor frequência nas formas paucibacilares da mesma (RICHARDUS *et al.*, 2017).

#### **4.4 Papel da sorologia no seguimento de contatos**

Polipeptídeos, lipossacarídeos, glicolipopeptídeos e glicolipídeos fenólicos (PGL) I, II e III são os principais grupos de antígenos das micobactérias. O grupo dos glicolipídeos fenólicos são específicos de *M. leprae* e apresentam capacidade de induzir resposta imunológica no indivíduo. As pesquisas com hanseníase evoluíram muito após o isolamento do glicolipídeo fenólico 1 (PGL I), tendo sido realizada a elucidação de sua estrutura química por Hunter e Brennan (BRENNAN; HUNTER, 1981).

O PGL-1 é uma molécula presente na parede celular de *M. leprae* (SPENCER; BRENNAN, 2011), sendo que anticorpos contra essa molécula são encontrados em indivíduos que apresentaram algum contato com a bactéria através de convívio prolongado com pacientes com hanseníase MB não tratada. Assim sendo, eles têm sido estudados como possíveis candidatos enquanto ferramenta no diagnóstico precoce da doença, bem como marcador de risco para o desenvolvimento da mesma (ARAÚJO *et al.*, 2012).

A sorologia está relacionada com a pesquisa de anticorpos ou antígenos e contribui muito para o diagnóstico de diversas doenças infecciosas e não infecciosas. Até pouco tempo atrás os testes sorológicos empregados na hanseníase eram utilizados apenas como ferramenta em pesquisas de campo, porém, recentemente através da portaria N° 84, de 31 de dezembro de 2021, o teste rápido imunocromatográfico para determinação qualitativa de anticorpos IgM anti-*Mycobacterium leprae* será

incorporado no Sistema Único de Saúde - SUS para diagnóstico complementar de hanseníase (BRASIL, 2021).

O método de ELISA indireto é o teste mais adequado para se demonstrar a presença de anticorpos contra PGL-1 no soro. Em resumo, esse método consiste em várias etapas, onde se utiliza conjugados marcados com enzimas, substrato e reagente cromogênico. A enzima interage com seu substrato e o produto dessa reação, por sua vez, reagirá com o cromógeno. Logo após ocorre uma reação de oxi-redução havendo a formação de uma solução colorida, de modo que a quanto maior a interação antígeno-anticorpo, mais intensa será a cor. A intensidade dessa cor é medida através de espectrofotômetro de placas (CUNHA, 2012).

O método de ELISA anti-PGL-1 pode ser qualitativo ou semi-quantitativo. No primeiro caso, é necessário um soro *cut-off* ou um valor de referência para separar os resultados positivos e negativos. Nos testes semi-quantitativos, os resultados podem ser expressos através de títulos, índices ou valores de densidade óptica (CUNHA, 2012).

Os testes rápidos de imunocromatografia, como o *ML Flow* são indicados para uso em pesquisas de campo por demonstrar alta concordância com o ELISA (91,0%) e possuir menor custo e maior facilidade de coleta, leitura e interpretação dos dados (BUHRER-SEKULA et al., 2003). Apesar disso, tais testes podem não ser completamente úteis, uma vez que não são capazes de quantificar anticorpos em amostras (CABRAL, et al., 2013).

Em crianças, por exemplo, quando os níveis de anticorpos são avaliados quantitativamente (VAN HOOIJ et al., 2017), níveis elevados ou em ascensão podem indicar transmissão recente (LYON et al., 2008; SARNO et al., 2012). Já em adultos, os níveis de anticorpos podem não conseguir discriminar infecção recente e passada (PIERNEEF et al., 2021).

Embora a sorologia não seja capaz de diferenciar entre infecção e doença, vários autores verificaram que a presença de anticorpos séricos anti-PGL-1 pode indicar um risco aumentado para o desenvolvimento da hanseníase (DOUGLAS et al., 2004; BARRETO et al., 2015; NAGAO-DIAS et al., 2019). Como exemplo, Penna et al. (2016) verificaram numa revisão sistemática com metanálise, que, o risco de desenvolvimento da hanseníase pode ser 3,6 vezes maior para contatos soropositivos para anti-PGL-1 do que naqueles que são negativos.

A molécula PGL-1 está presente na superfície externa da parede celular e comporta-se como um antígeno T-independente na maioria dos indivíduos infectados

por *M. leprae*, induzindo apenas a produção de anticorpo IgM. Entretanto, em alguns indivíduos, ele age como um antígeno T dependente parcial, também induzindo IgG e/ou IgA (MACEDO *et al.*, 2017).

Existe um inconveniente de se mensurar apenas o isotipo IgM nos inquéritos soropidemiológicos pois, existe possibilidade do resultado ser falso positivo. Sabe-se que o fator reumatoide é uma das principais causas de valores falso positivos na detecção de IgM (CABRAL *et al.*, 2013). Por exemplo fatores reumatóides podem ser produzidos em quantidades baixas em doenças infecciosas (IQBAL; SHER; RAB, 2000; HUNSPERGER, 2009) que leva à detecção inespecífica de IgM (MACEDO *et al.*, 2017).

Além disso, o isotipo IgM pode ser encontrado tanto na infecção quanto na doença. Porém, já foi demonstrado que o anticorpo IgM apresenta boa correlação com a carga bacilar (LOBATO *et al.*, 2011) e sua positividade sugere risco aumentado de desenvolver hanseníase (BARRETO *et al.*, 2015).

No estudo de Cabral e colaboradores (2013), 58% das amostras negativas para IgG apresentaram IgM positivo. Por outro lado, 71,4% das amostras IgG positivas também foram positivo para IgM. Nesse mesmo estudo dois indivíduos dos 17 que formaram o grupo controle, apresentaram positividade para IgM, no entanto, nenhum apresentou positividade para IgG sugerindo que ambos isotipos devem ser analisados.

Além disso, o IgG anti-PGL-1 parece estar associado com o risco de desenvolvimento da doença. Em estudo de acompanhamento de contatos de pacientes com hanseníase durante três anos consecutivos, foi observada uma forte associação entre soropositividade de IgG anti-PGL-1 e hanseníase, com risco relativo de 8,5 (NAGAO-DIAS *et al.*, 2019).

Diante do exposto, segue-se o trabalho realizado, conforme objetivos propostos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi contemplado com financiamento [CTI/CNPq/MS-SCTIE, processo 403461/2012-0, cujo título foi *Associação de parâmetros imunológicos e moleculares em sangue e secreções para detecção precoce de casos entre contatos abaixo de 15 anos de idade residentes em municípios de Alagoas e Itaitinga, CE*] e [FUNCAP/PPSUS/SESA, processo 3966535/2017, intitulado *Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares*].

### 5.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo transversal com contatos entre 4 e 15 anos de idade e casos índices de hanseníase. Em estudos transversais a coleta de dados ocorre em um recorte único no tempo, ou seja, os dados sobre a exposição e o desfecho são coletados simultaneamente. Assim, as investigações com recorte único no tempo, como no presente trabalho, possuem capacidade para estabelecer relações de causa e efeito ainda que limitadas em relação aos estudos longitudinais (PEREIRA, 1995). Optou-se por esse tipo de estudo pois buscou-se estimar a frequência de positividade de anticorpos anti- PGI-1 em contatos com risco de desenvolver a hanseníase, além dos fatores associados

### 5.2 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa processo 532.850,18/02/2014, realizando adendo para inclusão dos municípios São Gonçalo do Amarante e Canindé, do Estado do Ceará (**ANEXO 1**). A todos os participantes da pesquisa foi garantido o caráter sigiloso dos dados. Foi garantido anonimato do diagnóstico de hanseníase dos casos índices para fins de rastreamento dos contatos. Os responsáveis pelos contatos assim como os casos índices foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, após esclarecimento do escopo do projeto (**APÊNDICE B**). No que tange as crianças e jovens entre 8 e 15 anos de idade completos, a estes também era realizada explanação do projeto e, após esclarecimentos, eram convidados a assinar o Termo de Assentimento

(**APÊNDICE C**), conforme o Conselho Nacional de Saúde, através da Resolução 466 de 2012.

### 5.3 Locais selecionados para realização do estudo

Os locais selecionados para realização do estudo foram São Gonçalo do Amarante, CE e Canindé, CE, Santana do Ipanema, AL e Rio Largo, AL.

A **Tabela 1** apresenta a taxa de detecção de hanseníase nos municípios, de acordo com o ano em que foi realizada a coleta das amostras e a população estimada em 2020.

Tabela 1- População estimada por município em 2020, taxa de detecção de hanseníase em São Gonçalo do Amarante-CE, Canindé-CE, Rio Largo-AL, Santana do Ipanema-AL, de acordo com o ano em que foi realizada a coleta das amostras.

Municípios	População Estimada (IBGE, 2020)	Ano	Taxa detecção de casos (por 100.000 habitantes) (SAGE, 2021)
São Gonçalo do Amarante (CE)	48860	2018	18,55
Canindé (CE)	77240	2019	36,36
Rio Largo (AL)	75394	2016	15,85
Santana do Ipanema (AL)	47819	2016	20,83

Fonte: SAGE, 2021

#### 5.3.1 São Gonçalo do Amarante – CE

São Gonçalo do Amarante é um município do Estado do Ceará, localiza-se a 60 quilômetros de Fortaleza, e pertence à região metropolitana de Fortaleza. O município apresenta uma população de 43.890 habitantes, de acordo com o último censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), realizado em 2010 e com estimativa de 48.869 pessoas em 2020 (IBGE, 2020). Em torno de 65% da população reside em área urbana. Em relação às condições de habitação, o município conta com taxa de cobertura de esgoto e de água, de 53,98% e 99,6%, respectivamente. A média de moradores por domicílio é de 3,64 (IPECE, 2020).

O município divide-se em oito distritos: Croatá, Cágado, Pecém, Serrote, Siupé, Taíba, Umarituba e a sede municipal de São Gonçalo do Amarante (IPECE, 2020). O presente trabalho foi desenvolvido na Sede municipal de São Gonçalo do Amarante e no distrito de Croatá, pois nelas estavam concentrados o maior número de casos de hanseníase.

De 2014 a 2018, foram notificados ao Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), 69 casos de hanseníase em todo município de São Gonçalo do Amarante, sendo 13 casos em 2014, 20 casos em 2015, 11 casos em 2016, 8 casos em 2017, 9 casos em 2018 e 8 casos em 2019 (IPECE, 2020).

A proposta inicial do projeto era selecionar o maior número de casos notificados entre os anos de 2014 e 2018, entretanto, apenas 15 de 69 casos índices (21,7%) foram selecionados para participarem da pesquisa. As perdas dos demais casos estão relacionadas com dificuldade de localização do domicílio, não comparecimento do paciente para coleta da amostra de sangue, ausência de contatos intra ou peridomiciliares na faixa etária de 4 a 15 anos de idade e mudança de endereço.

Em 2018, ano de realização do estudo no município, a taxa de detecção de novos casos foi de 18,55 novos casos por 100.000 habitantes, sendo considerado município de alta endemia, e com taxa de detecção acima da média nacional, que foi de 13,64 novos casos por 100.000 habitantes no mesmo ano (SAGE, 2020).

### **5.3.2 Canindé – CE**

Canindé localiza-se no Centro-Norte do estado do Ceará, a 127 quilômetros de Fortaleza. Segundo dados do IBGE, a população residente estimada para 2020 no município foi de 77.244 habitantes sendo considerada o décimo município cearense com maior número de habitantes. O equivalente a 62,94% da população concentra-se na área urbana, que apresenta baixa taxa de cobertura de esgoto urbana (24,13%). A média de moradores é de 3,72 por domicílio.

É uma cidade turística, sendo conhecida internacionalmente por apresentar o segundo maior santuário de São Francisco do mundo (IPECE 2020; IBGE 2020). O município possui um grande influxo de romeiros provenientes de vários locais do país, principalmente de outras localidades mais desfavorecidas da região Nordeste do Brasil.

No período de 2015 a 2019, foram registrados no SINAN, 115 casos de hanseníase no município. Com objetivo de facilitar a inclusão dos pacientes no estudo,

decidiu-se por selecioná-los de acordo com as unidades básicas de saúde (UBS) que possuíam os maiores números de registro. Assim, foram selecionados pacientes das seguintes UBS: João Paulo II (n=11), Santa Clara (n=8), Santa Luzia (n=17), Canindezinho (n=12), Capitão Pedro Sampaio (n=13). Desses, apenas 37 (32,2%) casos índices realmente participaram do estudo. Entre os motivos, alguns pacientes mudaram de município ou não compareceram a unidade durante o período de realização da coleta.

A taxa de detecção de casos novos em Canindé foi de 36,36 casos novos por 100.000 habitantes em 2019, ano em que foi realizada a coleta das amostras. O município foi considerado de muito alta endemia, de acordo com o Ministério da Saúde (SAGE 2020).

### ***5.3.3 Santana do Ipanema – AL***

Santana do Ipanema é um município localizado no Estado de Alagoas, região Nordeste do Brasil. Santana do Ipanema é a principal cidade do sertão alagoano, com população de 47.819 habitantes (IBGE, 2020). Sua economia é principalmente baseada na agricultura e serviços. As áreas onde os casos índices residiam apresentava pouco acesso a sistemas de esgoto.

Entre os anos de 2011 e 2015 foram registrados 143 casos de hanseníase em Santana do Ipanema, de acordo com os dados do SINAN, sendo 37 casos no ano de 2011, 29 casos em 2012, 27 casos em 2013, 31 casos em 2014 e 19 casos em 2015. As taxas de detecção para hanseníase no município de Santana do Ipanema foi de 20,83 por 100 mil habitantes em 2016. Santana do Ipanema foi considerado um município de muito alta endemia. (SAGE 2020).

### ***2.3.4 Rio Largo – AL***

Rio Largo é um município do Estado de Alagoas e localiza-se a 27 km da capital do Estado (Maceió), sendo a segunda cidade mais populosa da região metropolitana de Alagoas, com uma população de 75.394 habitantes (IBGE; 2020)

Entre os anos de 2011 e 2015 foram registrados 50 casos de hanseníase, sendo 9 casos no ano de 2011, 10 casos em 2012, 10 casos em 2013, 7 casos em 2014 e 14 casos em 2015 (ALAGOAS 2017; ARAÚJO *et al.*, 2017). Apenas 44 casos índices aderiram à participação no estudo no município de Santana do Ipanema e 3 de Rio Largo. Devido



ao baixo número de participantes em Rio Largo, os mesmos foram incluídos no grupo de casos índices de Santana do Ipanema. Considerando que foram integrados ao estudo 47 participantes, de um total notificado de 193 casos, verifica-se que 24,3% do total de casos índices foram avaliados na presente pesquisa. A baixa adesão dos pacientes em Rio Largo- AL pode ser explicada por o paciente não residir mais no mesmo município, óbito, ou porque não compareceu na data combinada para realização do estudo. A taxa de detecção para hanseníase em Rio Largo no ano de realização da pesquisa no município foi 15,85 por 100 mil habitantes (2016), sendo classificado como local de alta endemicidade para hanseníase (SAGE 2020).

#### 5.4 Casuística

A hanseníase é uma doença de notificação compulsória no Brasil (BRASIL, 2021a), assim, todos os pacientes têm seus dados clínicos e endereços cadastrados no Sistema Nacional de Informações de Agravos de Notificação (SINAN).

Foram selecionadas 377 notificações do SINAN que correspondiam ao número total de casos índices de hanseníase dos quatro municípios dos últimos em 5 anos contatando com ano em que começou a vigência dos projetos em cada município. As fichas dos casos foram selecionadas em cooperação com a Secretaria Municipal de Saúde de cada cidade.

A **Tabela 2** apresenta o número de casos selecionados em cada município, suas faixas etárias e formas clínicas da hanseníase, número de casos selecionados em 5 anos selecionados para o estudo, número estimado de contatos e cálculo amostral dos contatos.

Tabela 2- Faixas etárias e formas clínicas dos casos índices selecionados para pesquisa a partir da notificação do SINAN (período de 5 anos), número estimado de contatos e cálculo amostral dos contatos.

Municípios	Casos notificados SINAN (5 anos)	Número de casos em 5 anos selecionados para o estudo	Forma clínica dos casos índices		Faixa etária (anos)	Número estimado de contatos	Cálculo amostral dos contatos
			PB (n=34)	MB (n=65)			
São Gonçalo do Amarante	69	15	5	10	10 a 66	60	52
Canindé	115	37	7	30	15 a 97	148	107
Rio Largo	50	3	2	1	29 a 58		
Santana do Ipanema	143	44	20	24	4 a 81	188	127
<b>Total</b>	<b>377</b>	<b>99</b>	<b>34</b>	<b>65</b>		<b>396</b>	<b>286</b>

Fonte: própria; Legenda: PB (paucibacilar); MB (multibacilar). SINAN- Sistema Nacional de Informação de Agravos e Notificação

#### **5.4.1- Casos índices**

Os pacientes com hanseníase foram selecionados de acordo com o cadastro do SINAN de cada secretaria municipal de saúde e definidos como casos-índice. Eles foram convidados a comparecer a um centro de saúde, onde foi aplicado um questionário clínico e sociodemográfico (**APÊNDICE A**). Os casos índices foram classificados em paucibacilares ou multibacilares de acordo com a classificação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017).

#### **5.4.2- Contatos**

Considerando-se o número de casos selecionados no presente projeto e que para cada caso haveria hipoteticamente 4 contatos entre 4 e 15 anos de idade (2 intradomiciliares e 2 peridomiciliares), o cálculo amostral resultante, com intervalo de confiança de 95% e erro amostral de 5% foi de 286 contatos (Tabela 2).

A seleção dos contatos foi realizada em parceria com a Secretaria de Saúde de cada município e com auxílio dos Agentes Comunitários de Saúde (ACS). Os ACS fizeram visitas aos indivíduos selecionados para pesquisa e os convidaram para uma campanha de avaliação de hanseníase que haveria em local e data previamente estabelecido, no posto central de cada município.

Em São Gonçalo do Amarante- CE os indivíduos foram visitados em suas residências pela equipe de profissionais de saúde com experiência em atendimento de pacientes com hanseníase, incluindo enfermeiras, farmacêuticos e ACS locais.

Os contatos intradomiciliares (ID) eram aqueles que residiam na moradia do caso índice. Os contatos peridomiciliares (PD) eram aqueles que residiam até 5 casas de distância do caso índice para direita, esquerda e frente (NAGAO-DIAS *et al.*, 2019). Aqueles que frequentavam o domicílio do caso índice, mas não residiam com o mesmo foram também considerados como contatos PD.

Os contatos também foram classificados de acordo com a forma clínica dos casos índices, ou seja, em contatos multibacilares (MB) ou contatos paucibacilares (PB).

### **5.5 Avaliação Dermatoneurológica**

A avaliação dermatoneurológica dos participantes do estudo nos municípios de São Gonçalo e Canindé, CE, foi realizada pela Liga Acadêmica em Doenças Estigmatizantes (LADES - UFC), formada por acadêmicos de cursos das Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, coordenados pela Profa Dra. Paula Sacha Nogueira, depto. Enfermagem, UFC. A avaliação dermatoneurológica dos contatos nos municípios Santana do Ipanema e Rio Largo, AL, foi realizada por equipe de profissionais de saúde dos postos de saúde dos respectivos municípios e pela Profa Dra. Clódis Maria Tavares, Depto. Enfermagem, Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

A avaliação dermatoneurológica foi realizada conforme o protocolo do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Quando havia presença de lesões sugestivas, foi testada a sensibilidade térmica, dolorosa e tátil. O primeiro teste a ser realizado foi o da sensibilidade térmica que consiste em tocar a lesão e uma região íntegra do indivíduo, para isso a equipe utilizou algodão embebido em álcool que corresponderia à sensação de frio e quente com algodão seco. A perda da sensibilidade dolorosa foi avaliada, realizando-se um leve toque com a ponta de uma agulha estéril e descartável na lesão e na pele íntegra. A sensibilidade tátil foi avaliada através de toque nas lesões com um chumaço de algodão seco, quando não era possível o uso do kit de estesiômetro, solicitando-se ao paciente que indicasse a área tocada. Como teste complementar a prova da histamina endógena também foi realizada em alguns contatos. Essa prova consistia em traçar uma reta na pele do paciente atravessando a lesão (área da lesão e pele íntegra) com uma tampa de caneta esferográfica (BRASIL, 2017).

A espessura dos nervos também foi avaliada através de palpação daqueles mais frequentemente acometidos pela doença (fibular, tibial posterior, ulnar, mediano, auricular, trigêmeo, mediano, radial) (BRASIL, 2017).

## **5.6 Coleta de dados e de amostras biológicas**

Em São Gonçalo do Amarante, CE, foram realizadas visitas domiciliares no período de outubro a dezembro de 2018 e de abril a junho de 2019, juntamente com os agentes de saúde. Durante as visitas, um questionário era aplicado. O questionário continha as seguintes informações: nome, idade, data de nascimento, sexo, endereço, tipo de parentesco ou não com caso índice, frequência de contato com o caso índice e outros. Em seguida, realizava-se um agendamento para o comparecimento dos contatos

e seus responsáveis aos postos de saúde com objetivo de se realizar a coleta de amostra de sangue.

Em Canindé, Rio Largo e Santana do Ipanema, considerando a distância dos municípios em relação à Fortaleza, foram realizados mutirões. Após explanação do projeto, era realizada aplicação de questionário, feita avaliação dermatoneurológica e coleta de amostras durante os turnos da manhã e da tarde no período de uma semana. Os agentes comunitários de saúde auxiliavam na parte de convocação dos contatos e seus responsáveis enquanto uma equipe de alunos e professores do projeto dividia-se entre as demais tarefas. Em Canindé, o estudo foi realizado durante a semana de 8 a 12 de julho de 2019; em Santana do Ipanema, durante a semana de 29 de fevereiro a 04 de março de 2016; em Rio Largo, durante a semana de 07 a 11 de março de 2016. Em cada município, foi selecionado um posto de saúde mais central, onde foram disponibilizadas salas para avaliação dermatoneurológica e laboratório para coleta, assim como um profissional capacitado para coleta de amostras biológicas.

Em São Gonçalo do Amarante e Canindé, CE, foi desenvolvido um formulário eletrônico, utilizando a ferramenta Google Formulários, para coleta dos dados sociodemográficos das crianças e jovens selecionados para o estudo, assim como para a avaliação dermatoneurológica (**APÊNDICE A**). Em Santana do Ipanema e Rio Largo, AL, foram realizados formulários impressos tanto para o preenchimento dos dados sociodemográficos, como para avaliação dermatoneurológica.

De cada participante foram coletados 4 mL de sangue em tubo contendo ativador de coágulo para obtenção do soro. Foi aguardado um tempo de aproximadamente 30 minutos antes que os tubos fossem centrifugados (10 minutos a 1500 rpm). As amostras de soro eram armazenadas em alíquotas a -20° C e posteriormente transportadas em caixas de isopor com gelo reciclável para o Laboratório de Imunologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), UFC, onde eram armazenadas a -20° C até o momento da análise.

As amostras coletadas foram transportadas para o Laboratório de Imunologia em caixas térmicas contendo gelo seco, no caso dos municípios de Alagoas e nos municípios do Ceará em caixas térmicas contendo gelo reciclável.

## **5.7 Determinação anticorpos séricos**

Os testes imunoenzimáticos para dosagem de IgG, IgA e IgM sérica anti-PGL-1 foram realizados no Laboratório de Imunologia, DACT, UFC. O protocolo dos testes foi seguido conforme descrito por MACEDO *et al.* (2017) com modificações.

Uma concentração de 5 µg/mL de antígeno glicolipídio fenólico PGL-1, de *M. leprae*, gentilmente doado pela BEI Resources (USA), foi preparada em álcool etílico absoluto e volumes de 50 µL foram adicionados a placas de poliestireno (Costar, USA), incubando-se por 2h a 37°C até completa evaporação do álcool.

Após a etapa de adsorção do antígeno às placas, as mesmas foram incubadas com 100 µL solução de salina tamponada com fosfato (PBS) - soro fetal bovino (SFB) 1% por 2h a 37°C. A seguir, a solução foi desprezada e amostras de soro diluídas a 1:200 em PBS-SFB 0,5% foram adicionadas às placas em volumes de 50 µL por poço (em duplicata). Após incubação por 2h a 37°C, as placas foram submetidas a um ciclo de 4 lavagens com PBS-SFB 0,05%. Em seguida, conjugados anti-IgM (Sigma, USA), anti-IgA (Sigma, USA), ou anti-IgG (Sigma, USA), marcados com peroxidase forma diluídos a 1:2500, 1:9000 e 1:20000, respectivamente, e adicionados em volumes de 50 µL aos poços. As placas foram incubadas por 1h30 min a 37°C. Após novas lavagens, foram adicionadas às placas 100 µL da solução de substrato contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na concentração final 0,01% e tetrametilbenzidina 1 mg/mL (Thermo, USA). Após um período de 30 min a temperatura ambiente, a reação era interrompida, adicionando-se 25 µL de solução de ácido sulfúrico 1N. A leitura era realizada em espectrofotômetro de placas em comprimento de onda 450 nm (ASYS Expert Plus, Biochrom, UK).

Os resultados foram expressos em índices, a partir da relação de densidade óptica da amostra teste dividida pela densidade óptica da amostra controle. A amostra *cut-off* era constituída de um *pool* de soro humano normal, ou seja, proveniente de amostras de soro de 50 doadores de sangue locais, soronegativos para HIV, Chagas, hepatites B e C, HTLV, sífilis e que não apresentavam hanseníase no momento da coleta da amostra, provenientes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE). Essas amostras foram agrupadas (*pool*) e empregadas como amostra *cut-off* em todos os testes para obtenção dos índices. Amostras controles negativos e positivos foram também foram incluídos. Densidades ópticas das amostras eram previamente descontadas dos brancos (poços contendo apenas antígeno, conjugado, solução de substrato e cromógeno). Os índices eram calculados, dividindo-se as densidades ópticas das amostras (média das duplicatas – branco) pelas densidades

ópticas da amostra *cut-off* (-branco). Foram considerados positivos índices equivalentes ou superiores a 1,2 para IgG e IgM e 1,1 para IgA (MACEDO *et al.*, 2017).

## 5.8 Análise Estatística

Os dados dos formulários *Google forms* foram exportados para o programa Excel 2013, da Microsoft Office, assim como os resultados das análises sorológicas. Os dados foram analisados por meio de testes não paramétricos, pois os mesmos não seguiram uma distribuição gaussiana (teste de Kolgomorov-Smirnov). O teste de Kruskall-Wallis foi utilizado para comparar os níveis de anticorpos de três ou mais grupos. O teste de Fisher foi empregado para analisar a possível associação entre a frequência de positividade ou negatividade anticorpos em casos índice de hanseníase e contatos. O *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança de 95% foram calculados para avaliar a chance de apresentar hanseníase e de apresentar 1 ou  $\geq 2$  isotipos de anticorpos séricos positivos. Sensibilidade e especificidade diagnóstica e valores preditivos positivos e negativos também foram calculadas, levando em consideração o diagnóstico clínico como padrão-ouro. Todas as análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism versão 6.0, e o nível de significância estatística foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Perfil clínico e demográfico de pessoas com hanseníase

Foram incluídos no estudo 30 casos-índices do sexo feminino (mediana de idade: 46 anos) e 41 casos índices do sexo masculino (mediana de idade: 50 anos) (Tabela 3). Os casos índices foram classificados de acordo com a classificação operacional adotada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Dessa forma, foram avaliados 50 casos índices multibacilares (MB) e 21 casos índices paucibacilares (PB).

Tabela 3- Classificação dos casos (n=71), segundo sexo, faixa etária e classificação operacional da hanseníase.

	Casos- índices (n= 71)	
	Sexo feminino (n=30)	Sexo masculino (n=41)
Faixa etária (anos de idade)/ <b>mediana</b>	(10-81)/ 46	(15-97)/ 50
Classificação operacional		
PB	12 (40%)	09 (22%)
MB	18 (60%)	32 (78%)
<b>Tempo de tratamento</b>		
Em tratamento	18 (25,4%)	
Tratados há 1 ano	12 (16,9%)	
Tratados há 2 anos	6 (8,5%)	
Tratados há 3 ou mais anos	25(32,2%)	

Legenda: PB= paucibacilar e MB =multibacilar

Em relação ao período de tratamento que se encontravam, quando foram selecionados, a maioria, ou seja, 35,2% dos pacientes haviam completado 3 ou mais anos após o tratamento. As informações sobre o tratamento de dez casos índices (14,1%) estavam faltando na ficha do SINAN.



## **6.2 Perfil clínico e demográfico de contatos intra e peridomiciliares de pessoas com hanseníase**

O estudo incluiu 395 contatos de hanseníase na faixa etária de 4 a 15 anos, que foram divididos em dois grupos, contatos sem lesões (n= 340, denominados de contatos saudáveis) e contatos com lesões suspeitas (n= 55). Entre os contatos saudáveis (Tabela 4A), 175 eram crianças do sexo feminino (mediana de idade: 10 anos), e 165 eram crianças do sexo masculino (mediana de idade: 9 anos). Os participantes foram classificados como contatos ID (n= 67), contatos PD (n= 273), contatos de pacientes PB (n= 89) e contatos de pacientes MB (n= 251). Os contatos do sexo feminino corresponderam a 204 participantes (51,6%). Observou-se uma predominância de contatos PD (n=308, 78,0%) e de contatos de casos índices MB (n=283, 71,6%).

Entre aqueles com lesões suspeitas (Tabela 4B), havia 29 crianças do sexo feminino (mediana de idade: 11 anos) e 26 crianças do sexo masculino (mediana de idade: 10 anos). Os participantes foram classificados como contatos ID (n= 20), PD (n= 35), contatos de pacientes PB (n= 23) e contatos de pacientes MB (n= 32). Três deles apresentaram aumento na espessura de nervo. Os participantes com lesão suspeita ou aumento na espessura de nervo foram encaminhados ao centro de saúde para serem examinados por algum médico. Após a conclusão do projeto, sete contatos com suspeita obtiveram diagnóstico de hanseníase (6 com a forma clínica indeterminada e 1 com a forma clínica dimorfa da hanseníase).

Tabela 4- Classificação dos contatos (n=395), segundo sexo, faixa etária, tipo de convivência, ou seja, intra domiciliares (ID)/peridomiciliares (PD), presença/ausência de lesões e classificação operacional [multibacilar (MB)/paucibacilar (PB)].

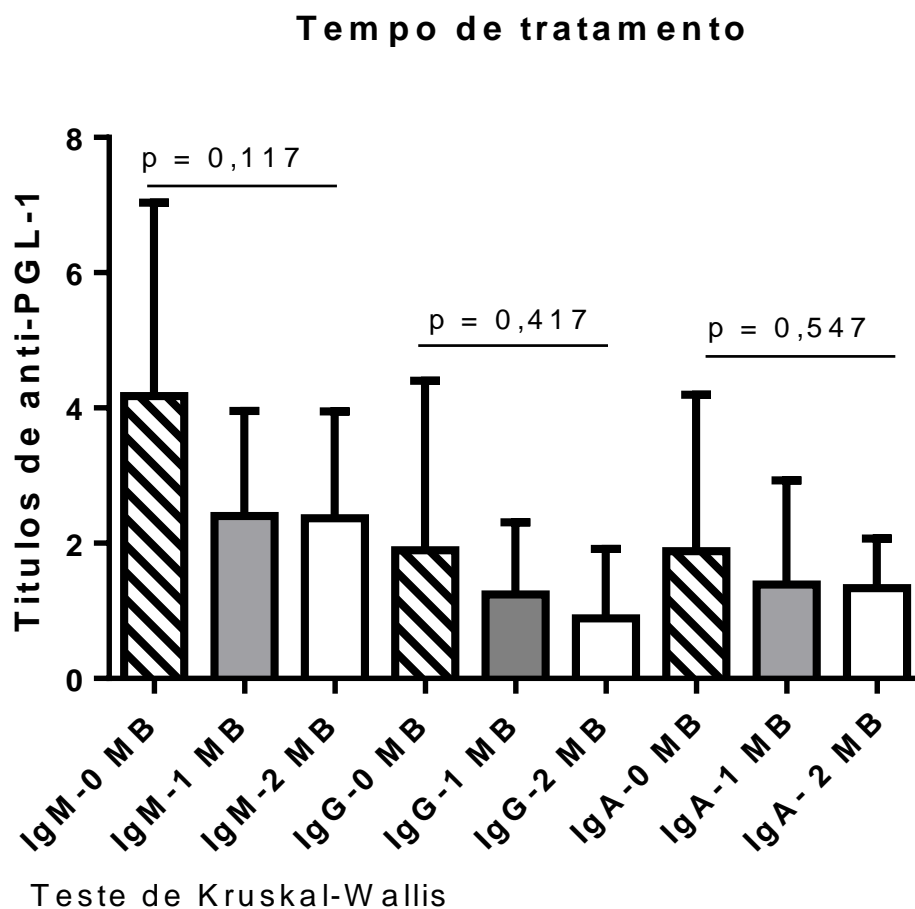
<b>A) Contatos sem lesões (contatos saudáveis); n=340</b>					
Sexo	Faixa etária (mediana)	Tipo de contato			
		ID n= 67		PD n= 273	
		PB	MB	PB	MB
<b>Feminino</b> n= 175	(4-15 anos de idade) 10	7	27	42	99
<b>Masculino</b> n=165	(4-15 anos de idade) 9	7	26	33	99
<b>B) Contatos com lesões e/ ou nervos espessados (n=55)</b>					
Sexo	Faixa etária (mediana)	Tipo de contato			
		ID n= 20		PD n= 35	
		PB	MB	PB	MB
<b>Feminino</b> n= 29	(4-15 anos de idade) 11	5	2	5	17
<b>Masculino</b> n= 26	(4-15 anos de idade) 9	9	4	4	9

Legenda: ID= contatos intradomiciliares; PD= contatos peridomiciliares; PB= paucibacilar e MB =multibacilar

Com objetivo de se verificar se o tratamento poderia interferir nos níveis de anti-PGL-1, foi realizada uma análise estatística, considerando-se apenas os casos multibacilares. Estes foram classificados de acordo com o período de tratamento em que se encontravam, quando ingressaram no estudo, ou seja, aqueles que se encontravam em tratamento ou que ainda não haviam iniciado o mesmo (0), tratados há um ano (1) e tratados há 2 ou mais anos (2). Conforme mostra a Figura 1, não foram encontradas

diferenças estatísticas em relação aos níveis de anticorpos e período de tratamento (teste de Kruskal-Wallis,  $p = 0,61$  para IgM,  $p = 0,075$  para IgG e  $p = 0,61$  para IgA).

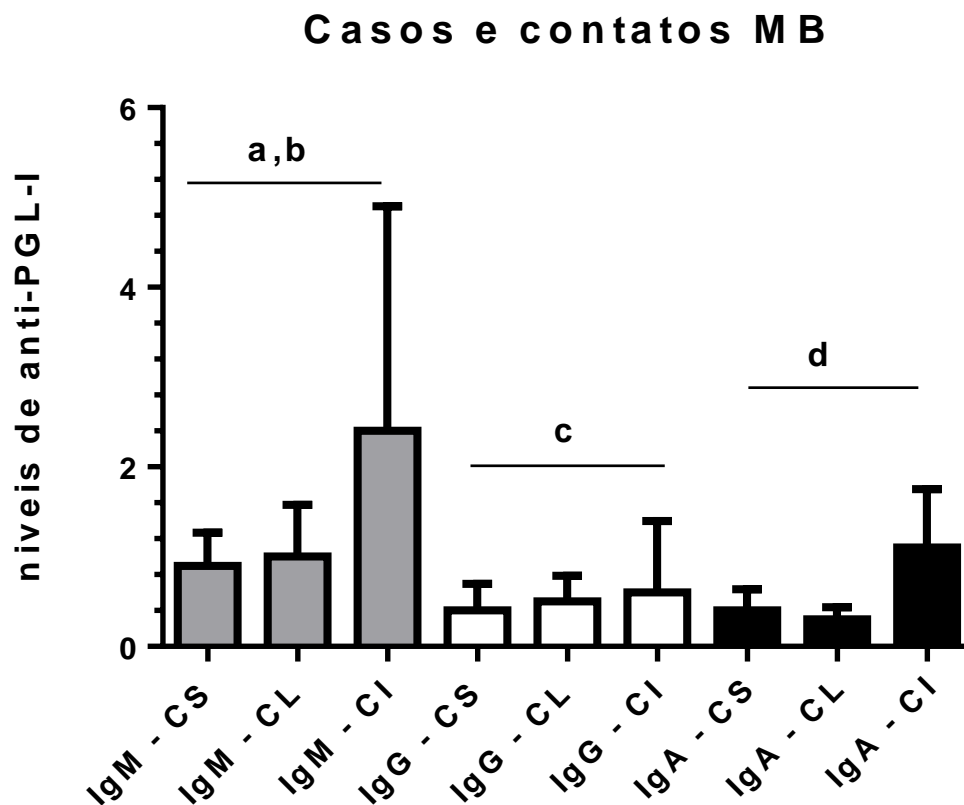
Figura 1: Níveis de anticorpos anti-PGL-1 em casos de hanseníase multibacilar (MB) selecionados quando se encontravam em tratamento (0), ou entre aqueles tratados há 1 ano (1), ou naqueles tratados há 2 ou mais anos (2).



### 6.3 Níveis de anticorpos séricos anti- PGL-1 nos cantatos e casos índices

A Figura 2 apresenta os intervalos interquartílicos e medianas dos níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos MB sem lesões (contatos MB saudáveis; n= 251), contatos MB com lesões suspeitas (n = 32), e casos índice de hanseníase MB (n= 50). Os níveis de IgM anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índice de hanseníase MB do que nos contatos MB saudáveis (teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ) e contatos MB com lesões (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ ). Os níveis de IgG anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índices de hanseníase MB do que nos contatos saudáveis (teste K-W,  $p < 0,001$ ). Os níveis de IgA anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índices de hanseníase MB do que nos contatos com ou sem lesões (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ).

Figura 2- Níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos multibacilares (MB) saudáveis (CS; n = 251), contatos MB com lesões suspeitas (CL; n = 32) e casos índice de hanseníase MB (CI; n = 50). O *cut-off* foi de 1,2 para IgM e IgG e de 1,1 para IgA.

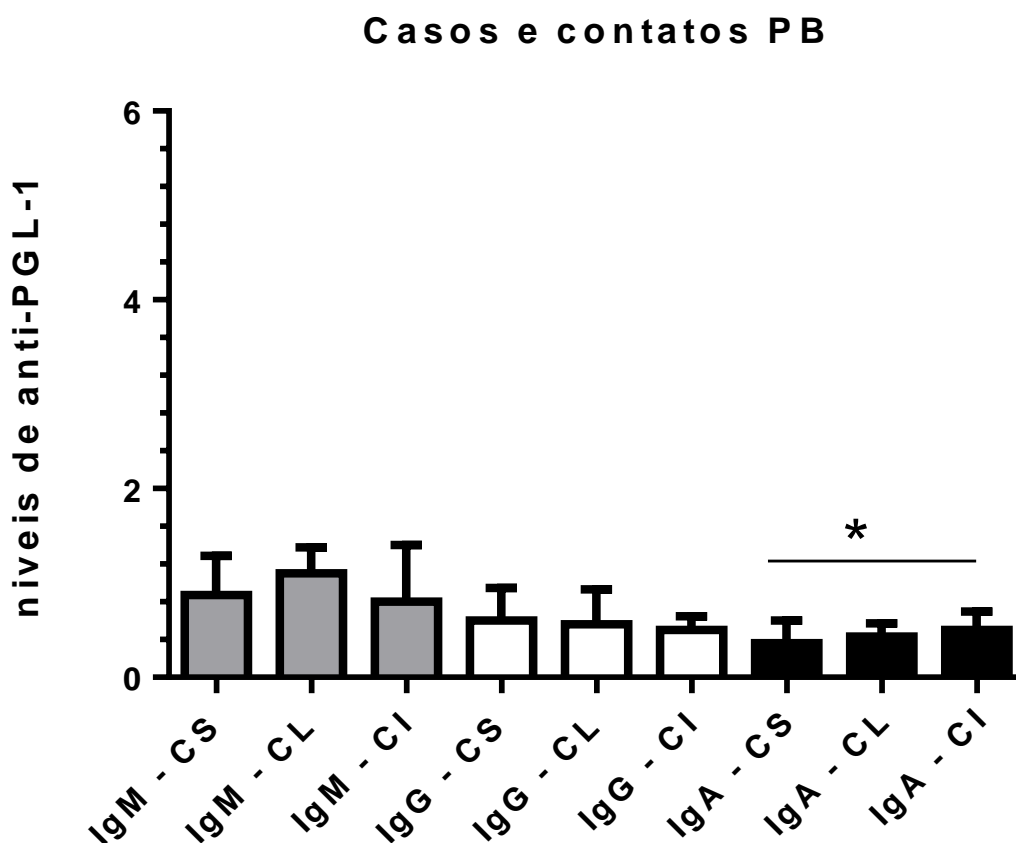


Legenda: CS= contatos saudáveis; LS= contatos com lesão suspeita; CI= casos índices

<sup>a</sup>Teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0.0001$ , níveis de IgM anti-PGL-1 mais elevados nos casos MB do que nos controles saudáveis; <sup>b</sup> $p < 0.01$ , Teste de Kruskal-Wallis, níveis de IgM anti-PGL-1 mais elevados nos casos MB do que nos contatos com lesões; <sup>c</sup> $p < 0.001$ , Teste de Kruskal-Wallis, níveis de IgG anti-PGL-1 mais elevados em casos MB do que nos contatos saudáveis; <sup>d</sup> $p < 0.0001$ , teste de Kruskal-Wallis, níveis de IgA-anti-PGL-1 mais elevados nos casos MB do que nos controles com ou sem lesões.

A Figura 3 apresenta os intervalos interquartílicos e medianas dos níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos paucibacilares saudáveis (n = 89), contatos PB com lesões suspeitas (n = 23) e casos índices de hanseníase PB (n = 21). O único que apresentou diferença estatística foi o isotipo IgA. Os níveis de IgA anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índice de hanseníase PB do que nos contatos sem lesões (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ ).

Figura 3- Níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos paucibacilares (PB) saudáveis (CS; n = 89), contatos PB com lesões suspeitas (CL; n = 23) e casos índices de hanseníase PB (CI; n = 21). O *cut-off* foi de 1,2 para IgM e IgG e de 1,1 para IgA.



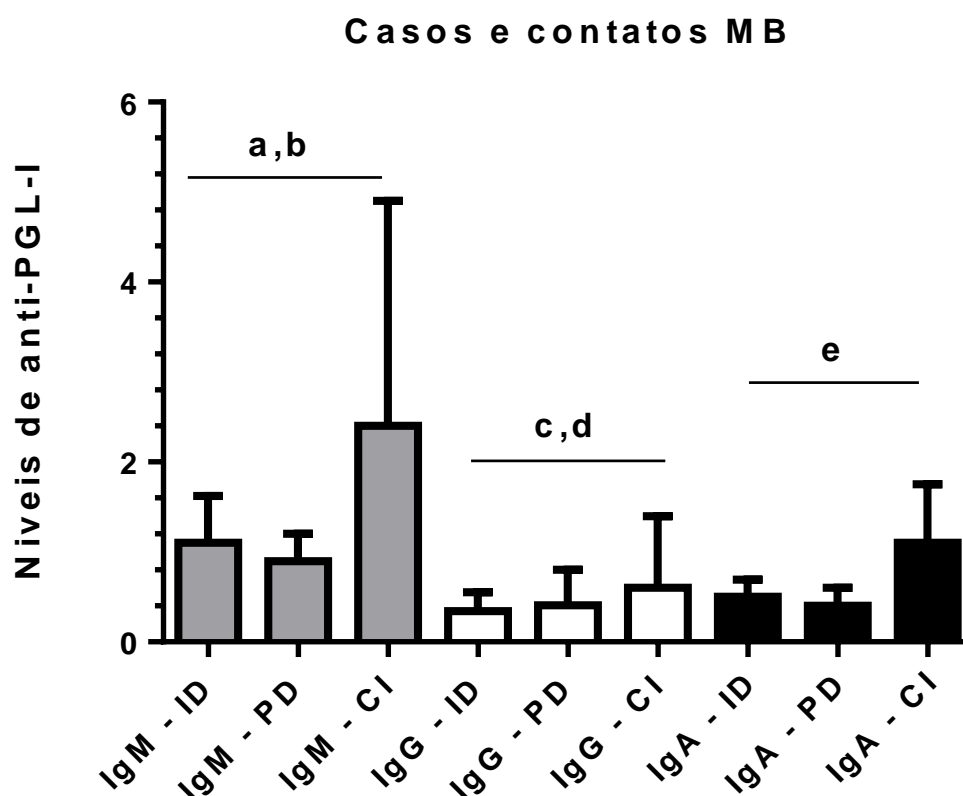
Legenda: CS= contatos saudáveis; LS= contatos com lesão suspeita; CI= casos índices

\*Teste de Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$ , Níveis de IgA anti-PGL-1 mais elevados nos casos PB do que nos controles sem lesões.

A Figura 4 apresenta os intervalos interquartílicos e medianas dos níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos MB intradomiciliares de casos

índices MB (ID, n = 6), contatos peridomiciliares de casos índices MB (PD, n = 26) e casos índices de hanseníase MB (n = 50). Os níveis de IgM anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índices de hanseníase MB do que nos contatos ID e PD (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,01$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente). Os níveis de IgG anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índices de hanseníase MB do que nos contatos ID e PD (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Os níveis de IgA anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índices de hanseníase MB do que nos contatos multibacilares ID e PD (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,0001$ ).

Figura 4- Níveis de IgM, IgG e IgA em amostras de soro de contatos multibacilares (MB) intradomiciliares (CI, n = 6), contatos MB peridomiciliares (PD, n = 26) e casos índices de hanseníase MB (CI; n = 50). O *cut-off* foi de 1,2 para IgM e IgG e de 1,1 para IgA.



Legenda: ID= contatos intradomiciliares; PD= contatos peridomiciliares ; CI= casos índices

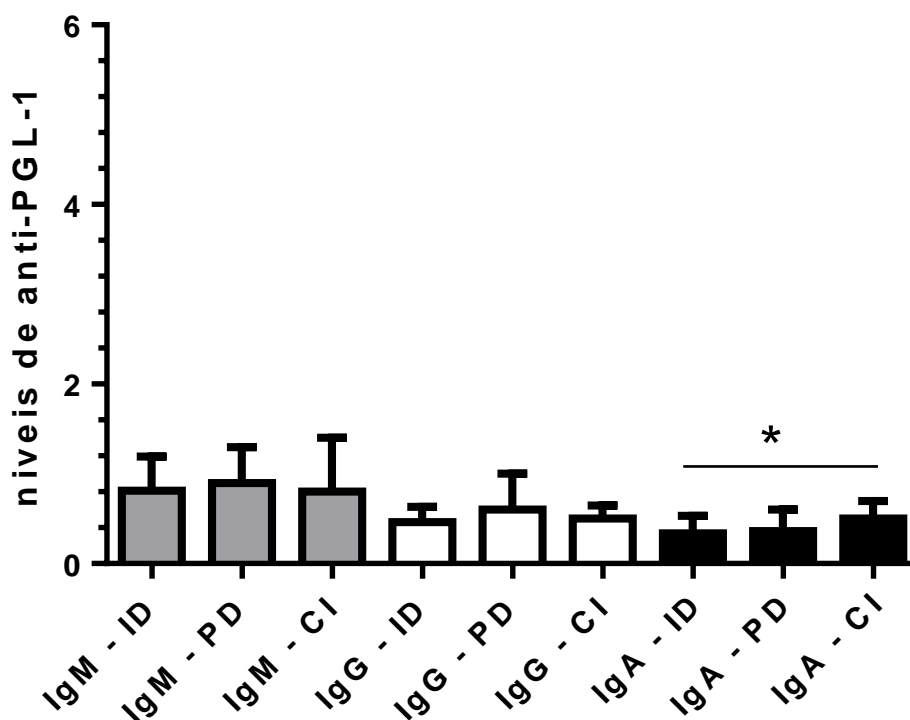
<sup>a</sup> $p < 0,0001$ , teste de Kruskal-Wallis, níveis de IgM anti-PGL-1 mais elevados nos casos índices MB do que os contatos PD; <sup>b</sup> $p < 0,01$ , teste de Kruskal-Wallis test, níveis de IgM anti-PGL-1 nos casos índices MB do que os contatos ID; <sup>c</sup> $p < 0,0001$ , teste de Kruskal-Wallis, níveis de IgG anti-PGL-1 nos casos índices MB do que os contatos ID; <sup>d</sup> $p < 0,01$ , teste de Kruskal-Wallis,

níveis de IgG anti-PGL-1 nos casos índices MB do que nos contatos PD;  $^c p < 0.0001$ , teste de Kruskal-Wallis, níveis de IgA anti-PGL-1 mais elevados nos casos índices MB do que os contatos ID e PD.

A Figura 5 apresenta os intervalos interquartílicos e medianas dos níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos PB intradomiciliares (ID, n = 14), contatos PB peridomiciliares (PD, n= 14) e casos índices de Hanseníase PB (n = 21). O único isotipo que apresentou diferença estatística foi o IgA. Os níveis de IgA anti-PGL-1 foram mais elevados nos casos índice de Hanseníase PB do que nos contatos PB peridomiciliares (teste Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ ).

Figura 5- Níveis de IgM, IgG e IgA anti-PGL-1 em amostras de soro de contatos paucibacilares (PB) intradomiciliares (ID, n= 14), contatos PB peridomiciliares (PD, n= 14) e casos índices de Hanseníase PB (n = 21)

### Casos e contatos PB



Legenda: ID= contatos intradomiciliares; PD= contatos peridomiciliares ; CI= casos índices

\* $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis, níveis de IgA anti-PGL-1 mais elevados nos casos índices do que nos contatos PB peridomiciliares.



#### 6.4 Frequência de positividade de anticorpos anti-PGL-1

A frequência de isotipos de anticorpos positivos foi avaliada em casos índice de hanseníase com a forma clínica PB (Tabela 5) e a forma clínica MB (Tabela 6) em associação com contatos saudáveis. Não foi encontrada associação entre a positividade de anti-PGL-1 e casos índice com a forma clínica PB, independente do isotipo (teste de Fisher,  $p= 1,0$  para IgM e IgG e  $p= 0,055$  para IgA). No entanto, uma forte associação foi encontrada para todos os isotipos de anticorpos, quando avaliados casos índice de hanseníase MB e controles sem lesão (teste de Fisher,  $p < 0,0001$  para IgM e IgA e  $p = 0,0014$  para IgG).

Em relação ao isotipo IgM, a *odds ratio* (OR) foi de 6,11 (IC 95% 3,08–12,16). Para o isotipo IgG, a OR foi de 3,31 (IC 95% 1,66-6,61). Para o isotipo IgA, a OR foi de 16,97 (IC 95% 8,39–34,2). Quando IgM positivo foi considerado em conjunto com um ou mais isotipos, observou-se uma associação significativa com os casos multibacilares (teste de Fisher,  $p < 0,0001$ ), tendo sido a OR de 21,0 (IC 95% 10,11-43,64). Verificou-se associação significativa também na presença conjunta de IgG e IgA (teste de Fisher,  $p < 0,0001$ ), sendo a OR de 17,58 (IC 95% 6,23–49,54).

A sensibilidade diagnóstica mais elevada foi observada para o isotipo IgM, equivalente a 76,0% (IC 95% 61,8- 86,9), e o valor mais baixo, correspondente a 24,1% (IC 95% 13,0- 38,2), foi observado para os isotipos IgG + IgA. Com relação à especificidade diagnóstica, o valor mais alto foi obtido para os isotipos IgG + IgA, equivalente a 98,2% (IC 95% 96,2-99,4), e o valor mais baixo, de 65,9% (IC 95% 60,6–70,9), para a presença de IgM, independentemente dos demais isotipos. Em relação aos valores preditivos positivos presumidos, o menor valor foi de 24,7% (IC 95% 18,1–32,3), obtido para IgM, e os maiores valores foram de 60,0% (95% IC 44,3-74,3) e 66,7% (IC 95% 41,0-86,7), observados para a presença conjunta de IgM e um ou mais isotipos e para os isotipos IgG + IgA. Os valores preditivos negativos foram elevados para todos os isotipos isolados ou associados. Por exemplo, para o isotipo IgM, o valor preditivo negativo foi de 94,9 (IC 95% 91,3-97,4), e para IgM associado a um ou mais isotipos foi de 93,3% (IC 95% 90,2-95,7).

Tabela 5- Frequência de níveis positivos/negativos de anti-PGL-1 em casos índices de hanseníase paucibacilar e contatos saudáveis.

	Soro anti-PGL 1									
	IgM		IgG		IgA		IgM + um ou mais isotipos		IgG + IgA	
	Casos índices (n=21)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=21)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=21)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=21)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=21)	Contatos saudáveis (n=340)
<b>Positivo</b>	7	116	2	39	4	22	3	18	1	6
<b>Negativo</b>	14	224	19	301	17	318	18	322	20	334
<b>Teste de Fisher</b>	<b>p=1.0</b>		<b>p=1.0</b>		<b>p=0.055</b>		<b>p=0.11</b>		<b>p=0.35</b>	

Tabela 6- Frequência de anti-PGL-1 positivos/negativos em casos índices com hanseníase multibacilar e contatos saudáveis.

	anti-PGL1 sérica									
	IgM		IgG		IgA		IgM + um ou mais isotipos		IgG + IgA	
	Casos índices (n=50)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=50)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=50)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=50)	Contatos saudáveis (n=340)	Casos índices (n=50)	Contatos saudáveis (n=340)
<b>Positivo</b>	38	116	15	39	27	22	27	18	12	6
<b>Negativo</b>	12	224	35	301	23	318	23	322	38	334
<b>Teste de Fisher</b>	<b>p&lt;0,0001</b>		<b>p = 0,0014</b>		<b>p&lt;0,0001</b>		<b>p&lt;0,0001</b>		<b>p&lt;0,0001</b>	
<b>Odds ratio (IC95%)</b>	6,11 (3,08 – 12,16)		3,31 (1,66 – 6,61)		16,97 (8,39 – 34,2)		21,0 (10,11– 43,64)		17,58 (6,23– 49,54)	
<b>Sensibilidade diagnóstica (IC95%)</b>	76,0 (61,8 – 86,9)		30,0 (17,8 – 44,6)		54,0 (39,3 – 68,2)		54,0 (39,3 – 68,2)		24,0 (13,0 – 38,2)	
<b>Especificidade diagnóstica (IC95%)</b>	65,9 (60,6 – 70,9)		88,5 (84,7 – 91,7)		93,5 (90,4 – 95,9)		94,7 (91,8 – 96,8)		98,2 (96,2 – 99,4)	
<b>Valor preditivo positivo (IC95%)</b>	24,7 (18,1 – 32,3)		27,8 (16,5 – 41,6)		55,1 (40,2 - 69,3)		60,0 (44,3 – 74,3)		66,7 (41,0 – 86,7)	
<b>Valor preditivo negativo (IC95%)</b>	94,9 (91,3 – 97,4)		89,6 (85,8 – 92,6)		93,3 (90,0 – 95,7)		93,3 (90,2 – 95,7)		89,8 (86,3 – 92,7)	

## 7 DISCUSSÃO

Apesar da hanseníase ter sido eliminada como problema de saúde pública em muitos países, o Brasil continua sofrendo com elevadas taxas de detecção de casos novos, diagnóstico tardio e GIF 2 no momento do diagnóstico (SALGADO *et al.*, 2016). O diagnóstico na atenção primária é essencialmente clínico, baseado na busca de lesões com sensibilidade alterada e/ou nervos espessados (BRASIL, 2017). O controle da doença sofre desafios por conta de seu longo período de incubação, dificuldade no diagnóstico nas fases iniciais, lesões cutâneas parecidas com as de outras enfermidades, e pelo fato de não haver testes laboratoriais com boa sensibilidade diagnóstica, além da falta de conhecimento do profissional de saúde (STAFIN; GUEDES; MENDES, 2018). Além disso, a falta de atenção do governo pode afetar diretamente a qualidade do serviço prestado à população. Um importante parâmetro na epidemiologia da hanseníase é a detecção de casos novos entre indivíduos abaixo de 15 anos de idade, uma vez que parecem estar relacionados com infecções recentes e representam transmissão ativa da bactéria na comunidade oriunda de indivíduos bacilíferos não tratados (LANA *et al.*, 2013). Tal fenômeno certamente revela uma falha nas medidas que visam controlar a doença (SALGADO *et al.*, 2016).

Há fatores ambientais que propiciam a perpetuação da micobactéria no meio ambiente, uma vez que a doença acomete a população mais carente que possui moradias com poucos cômodos, baixa ventilação, baixa exposição solar, elevada umidade, condições sanitárias precárias e várias pessoas convivendo em um mesmo espaço físico (MONTEIRO *et al.*, 2015). Acrescido a esses fatores, há a problemática relacionada com a baixa sensibilidade diagnóstica dos testes laboratoriais, como a baciloscopia de raspado intradérmico, falta de medicamentos, ausência de sistematização do serviço e excesso de politização do sistema de saúde (HENRY *et al.*, 2016; BRASIL, 2017; OMS, 2021).

Há dois tipos de detecção, a busca ativa, que é raramente realizada, e a detecção passiva, ou seja, que a pessoa deve se dirigir ao posto de saúde, na tentativa de obter seu diagnóstico (MOURA *et al.*, 2013). A realização do diagnóstico da hanseníase através da detecção passiva não é suficiente para interromper a transmissão, nem reduz a problemática relacionada com o diagnóstico tardio (OMS, 2021). A busca ativa baseia-se no rastreamento de contatos que possuem convívio prolongado com um caso índice de hanseníase, independentemente de sua forma clínica através de um exame

dermatoneurológico minucioso desses indivíduos (LIMA *et al.*, 2016). Os contatos intradomiciliares são mais propensos a serem infectados e desenvolverem a doença; no entanto, dados mais recentes revelam a importância do contato social (vizinho, colega) (BARRETO *et al.*, 2015). Sabe-se que a forma multibacilar é considerada a forma transmissível devido à elevada carga bacilar (MOET *et al.*, 2006), no entanto, independentemente da forma clínica dos casos índices todos aqueles que residem na moradia do caso índice ou próximo devem ser investigados (BARRETO *et al.*, 2015).

É importante lembrar ainda que contatos menores de 15 anos, são mais susceptíveis de contrair a infecção do que os adultos, sendo que o risco pode ser mais elevado, quanto menor a idade da criança (MOET *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2017). Provavelmente, isso se deve à capacidade individual de resposta imune contra a micobactéria. Após a industrialização, com a mudança nos hábitos alimentares, fatores ambientais, além dos fatores genéticos, levaram a uma maior incidência de processos alérgicos em crianças, típicos do perfil imunológico Th2 (HENRY *et al.*, 2016). Pensando em termos de resposta imune contra a hanseníase, o perfil Th2 irá contribuir para um pior prognóstico, pois, o mesmo auxilia com a produção de anticorpos, cujos mecanismos são inadequados para o controle da disseminação bacteriana (DE SOUSA *et al.*, 2017). Dessa forma, o diagnóstico tardio na criança pode indicar uma maior que a probabilidade da mesma vir apresentar a forma multibacilar com riscos de sequelas físicas. Este fato revela a enorme importância do diagnóstico precoce em crianças.

A partir da realização de busca ativa, encontramos 55 crianças com lesões suspeitas e/ou espessamento de nervos entre os 395 participantes avaliados (13,9%). Vinte delas (36,3%) eram contatos intradomiciliares e 35 (63,6%), contatos peridomiciliares. Além disso, 23 participantes (41,8%) eram contatos de casos índices paucibacilares e 32 (58,2%), contatos de casos multibacilares.

A busca ativa é uma estratégia utilizada por grupos de pesquisa (BARRETO *et al.*, 2014; 2015) e ligas acadêmicas, elevando o número de indivíduos que poderão ser diagnosticados precocemente. Essas ações voluntárias da sociedade ou da academia favorecem a melhora no diagnóstico (WANG *et al.*, 2020). Entretanto, para que tais ações sejam consideradas realmente efetivas necessitam de uma colaboração estreita com o serviço municipal de saúde. Caso o município não demonstre interesse, todo o trabalho se perde ao longo do caminho. Assim sendo, algumas limitações e dificuldades foram encontradas ao longo de nossa pesquisa. As nossas equipes eram compostas por estudantes e profissionais da Enfermagem e da Farmácia, bem como da Fisioterapia e

por biomédicos. Os profissionais não médicos podem realizar a suspeição da hanseníase, no entanto, é necessário um clínico ou dermatologista para confirmação ou exclusão do diagnóstico.

Em nosso trabalho, embora as crianças com suspeição tenham sido encaminhadas para avaliação médica, apenas aquelas residentes em Santana do Ipanema foram avaliadas (n=27), sendo que dessas, 7 obtiveram o diagnóstico de hanseníase (realizado por uma médica que aceitou colaborar com o projeto naquela localidade). As demais crianças não foram avaliadas, seja por um desconhecimento sobre a doença por parte do profissional médico, negligência ou pelo fato do serviço de saúde não as ter encaminhado ao médico local. Em Rio Largo, como exemplo, foram diagnosticadas 2 crianças por nossa colaboradora, no entanto, foi considerado erro de diagnóstico por uma médica do município. Em São Gonçalo do Amarante, médicos do município não aceitaram realizar o diagnóstico, caso não fosse realizada baciloscopia de raspado intradérmico e a mesma não resultasse positiva. Em Canindé, nossa equipe não obteve o retorno se as crianças com suspeição da doença foram examinadas pelos médicos locais. Nas unidades de saúde locais, há uma grande rotatividade de médicos. Dessa forma, aquele que recebe a capacitação técnica nem sempre permanece no trabalho. Os novos médicos nem sempre possuem conhecimento suficiente para diagnosticar a hanseníase em crianças. É possível que o uso da tecnologia digital possa vir a contribuir, permitindo que um maior número de profissionais tenha acesso a cursos de aperfeiçoamento ou de atualização ministrados à distância. Entretanto, ainda não sabemos o quanto esse tipo de estratégia poderá vir a melhorar a capacitação técnica desses profissionais.

A hanseníase na forma indeterminada indica diagnóstico precoce. Além de contribuir para a quebra da cadeia de transmissão, o paciente consegue se curar, sem ocorrências de complicações que comprometam sua qualidade de vida, como as reações de hipersensibilidade, e incapacidade física. Entre os 7 contatos com diagnóstico de hanseníase (co-prevalência), 6 apresentaram a forma indeterminada e 1, a forma dimorfa.

A BCG tem sido a única estratégia utilizada na prevenção contra hanseníase (SALES *et al.*, 2011). Sabe-se que a BCG vacinal não é capaz de impedir que o indivíduo desenvolva a hanseníase, mas induz melhora na resposta imune celular, de forma a contribuir com um mecanismo imunológico mais efetivo contra a micobactéria (BRASIL, 2017; BRASIL, 2021c). O uso da vacina baseia-se no fato de que o agente

etiológico da hanseníase apresenta vários antígenos comuns ao gênero *Mycobacterium* e que, portanto, induz resposta imune celular contra os mesmos. As crianças que não apresentam lesão devem ser vacinadas com BCG intradérmico a depender do número de cicatrizes vacinais (BRASIL, 2017). Quem apresenta 0 ou 1 cicatriz vacinal recebe uma dose da vacina e aqueles com 2 cicatrizes vacinais não recebem nenhuma dose. Observamos em nosso trabalho que 84,5% das crianças apresentavam 1 cicatriz da BCG, 8,7% apresentavam 2 cicatrizes, 4 %, nenhuma cicatriz (dados não apresentados). Não encontramos tal informação em 2,8% dos questionários. Encaminhou-se solicitação de vacinação com uma dose da BCG para aquelas que apresentavam 0 ou 1 cicatriz vacinal.

Um outro ponto que está relacionado com os desafios na hanseníase diz respeito à questão de um biomarcador que possa predizer o desenvolvimento da hanseníase no contato (SMITH, 2014) bem como também a necessidade de uma ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce da doença. Como na hanseníase praticamente não há testes laboratoriais que auxiliem o diagnóstico clínico, a confirmação da doença pode tardar até 10 anos, quando já ocorrem incapacidades físicas (YAGHOBI *et al.*, 2010; HENRY *et al.*, 2016). Embora testes diagnósticos já foram desenvolvidos para uma grande diversidade de doenças infecciosas (DELFORGE, 2011), mesmo para aquelas descritas recentemente (WEST, 2021), o único exame laboratorial disponível é a baciloscopia intradérmica, que pode ter resultado negativo nos casos de formas clínicas paucibacilares da hanseníase (BRASIL, 2017).

Como testes laboratoriais de apoio, podemos pensar em ferramentas moleculares e sorológicas, uma vez que o bacilo não é cultivável. Os testes moleculares têm sido de grande utilidade para uma infinidade de patologias. No que diz respeito à hanseníase, recentemente foi aprovado o uso do kit-NAT pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MENESES, 2021). Trata-se de um teste de biologia molecular para detecção de DNA de *M. leprae* em amostras de biópsia ou de nervos. Seu emprego deve ser associado ao teste da baciloscopia de raspado intradérmico de forma a favorecer a detecção do material genético da micobactéria em casos que a baciloscopia seja negativa (BRASIL, 2021b). Para uso em contatos sem lesão suspeita ou com lesão com aspectos da forma indeterminada não seria recomendado o seu uso. A busca de material genético da micobactéria em *swab* nasal não está associado com doença, mas com infecção (MARTINEZ *et al.*, 2011). Dessa forma, com todas as limitações, a sorologia continua sendo uma boa alternativa para a detecção de anticorpos, bem como

se estiver associada à busca de outras moléculas presentes na resposta imunológica contra a micobactéria (VAN HOOJI; GHELUK, 2021).

Em um trabalho anterior, pudemos demonstrar no município de Rio Largo, AL, que 36% dos contatos abaixo de 15 anos de idade avaliados apresentaram IgM salivar anti-PGL-1, enquanto que em Santana do Ipanema, o índice de positividade foi de 12,3% (MACEDO *et al.*, 2017). Como a meia vida da IgM é curta, em torno de 5 dias, sua presença na saliva indica que o indivíduo está sob exposição recente com a micobactéria, através das mucosas, possivelmente via oral e nasal. Anticorpos na saliva representam resposta imune de mucosas e, portanto, de forma indireta, indicam contato com *M. leprae* que está circulando no meio ambiente (MACEDO *et al.*, 2017). Embora a presença de anticorpos salivares não esteja associada com o risco de desenvolvimento da doença, indica exposição ambiental ao bacilo. O município de Rio Largo, no ano de 2016, quando foi realizada a pesquisa, a taxa de detecção da doença era de 15,85 casos por 100 mil habitantes, enquanto em Santana do Ipanema era de 20,83 casos por 100 mil habitantes. Os dados desse estudo mostraram que possivelmente no futuro o município de Rio Largo irá aumentar o número de casos diagnosticados. Dessa forma, o uso do teste para anticorpos salivares nesse caso serviu para revelar a presença da bactéria na comunidade.

Se um contato começa a produzir anticorpos salivares, isto não indica necessariamente que ele irá se infectar com o microrganismo, pois a resposta imune de mucosas pode conter o patógeno a nível de nasofaringe (MACEDO *et al.*, 2017). No entanto, encontrar anticorpos no soro significa que já ocorreu a infecção sistêmica (NAGAO-DIAS *et al.*, 2019). Assim sendo, a pergunta que norteia os pesquisadores é se os anticorpos séricos poderiam ser utilizados como marcador de risco ou no diagnóstico precoce.

A titulação de IgM anti-PGL-1 tem sido utilizada em contatos (BARRETO *et al.*, 2014), e não necessariamente indica doença, uma vez que IgM positivo pode ser encontrado em ambas as circunstâncias. Como a sorologia não diferencia infecção e doença, ela não é utilizada na rotina clínica, mas tem sido empregada largamente em pesquisas, desde a descrição do antígeno glicolípido- fenólico lipídico-1, específico de *M. leprae* (BRENNAN; BARROW, 1980), principalmente como marcador de risco para o desenvolvimento da doença (HENRY *et al.*, 2016).

Bazan- Furini e colaboradores (2011) sugeriram a detecção de anticorpos IgM anti-PGL-1 em contatos de pacientes com hanseníase, uma vez que a soropositividade



pode indicar risco aumentado do desenvolvimento da doença. Outra sugestão levantada é que aqueles com positividade de IgM anti-PGL-1 sejam examinados periodicamente (AROCHA *et al.*, 2006). Com todas limitações que o teste para identificação de IgM possa apresentar, acredita-se que há uma boa correlação entre o isotipo e a carga bacteriana (LOBATO *et al.*, 2011) e que sua positividade indica um risco aumentado para o desenvolvimento da hanseníase (BARRETO *et al.*, 2015).

Araújo *et al.* (2015) observaram em um estudo longitudinal de 10 anos, que aqueles que eram soropositivos para IgM anti-PGL-1 apresentavam risco de 5,7 vezes de desenvolver hanseníase. Os autores confirmaram doença em 2% dos participantes. Penna *et al.* (2016) verificaram em uma revisão sistemática e meta-análise que contatos soropositivos apresentam risco 3,6 vezes maior de desenvolver hanseníase do que soronegativos. De acordo com seus dados, os autores encontraram um OR de 3,05, com sensibilidades diagnósticas que variaram de 1,96 a 39,29% e especificidade diagnóstica de 83,52 a 98,03%.

Leturiondo *et al.* (2019) ressaltam que apesar de que os testes sorológicos apresentam uma série de limitações, eles podem auxiliar na rotina clínica, diferenciando hanseníase de outras afecções dermatológicas. De acordo com seus dados, as sensibilidades diagnósticas foram de 32% e 81%, para as formas paucibacilar e multibacilar, respectivamente, especificidades diagnósticas de 81,7% e 99%, valores preditivos positivos de 14,9% e 43,3% e valores preditivos negativos de 92,9% e 94,6%, respectivamente.

A maior parte da literatura foca o isotipo IgM contra o glicolípido fenólico-1 (PGL-1). O PGL-1, por se tratar de uma molécula lipídica, é considerado um antígeno T-independente (SPENCER; BRENNAN, 2011), ou seja, capaz de induzir basicamente IgM, não necessitando da presença de citocinas provenientes dos linfócitos T para sua produção. Os testes imunoenzimáticos em fase sólida do tipo indireto para pesquisa de IgM anti-PGL-1 têm apresentado boa sensibilidade diagnóstica para sua identificação, basicamente nas formas multibacilares da doença (KAMPIRAPAP; SINTHARN, 1996; ZENHA *et al.*, 2009).

Poucos trabalhos referem-se a outros isotipos, como IgA, por exemplo (SCHWERER., *et al.* 1989; CHUJOR *et al.*, 1991). Apesar de sabermos que PGL-1 trata-se de um antígeno T-independente, decidimos investigar biomarcadores alternativos, como os isotipos IgA e IgG, baseados em achados prévios, onde pudemos demonstrar que antígenos lipídicos podem induzir respostas imunes dependentes de T, quando as

bactérias são fagocitadas e processadas (NAGAO *et al.*, 2001). Tais achados nos estimularam a buscar por IgG anti-PGL-1 em pacientes (NAGAO-DIAS *et al.*, 2007) e contatos (CABRAL *et al.*, 2013).

Posteriormente, decidimos analisar a presença de IgA sérica anti-PGL-1 em pacientes (MACEDO *et al.*, 2017). No trabalho, foi demonstrada forte correlação entre os níveis de anti-PGL-I IgM e IgA ( $r=0,74$ ;  $p<0,0001$ ), e associação moderada entre os testes (coeficiente Kappa de 0,48). Na forma clínica da hanseníase multibacilar, as sensibilidades diagnósticas para IgM, IgG e IgA foram de 81,3%, 21,9% e 53,1%, respectivamente. Na forma clínica da hanseníase paucibacilar, as sensibilidades diagnósticas foram de 59,1%, 22,7% e 40,9%, respectivamente. As especificidades diagnósticas foram de 88,2% para IgM e 100% para IgG e IgA. Por isso, naquele momento, sugerimos a inclusão do isotipo IgA no seguimento dos contatos, além dos isotipos IgG e IgM. A razão de se buscar outros marcadores, além de IgM, deve-se ao fato de que, apesar deste isotipo apresentar uma boa sensibilidade diagnóstica (principalmente nas formas multibacilares), sua especificidade diagnóstica não é boa, afetando seu valor preditivo positivo.

Resultados falsos positivos para IgM são descritos na literatura em várias circunstâncias. Verifica-se produção de fator reumatoide (FR) em doenças infecciosas, auto-anticorpo do isotipo IgM, cujo alvo é IgG. Como exemplo de doenças infecciosas, onde há presença de FR, temos a toxoplasmose (NAOT *et al.*, 1981), malária (IQBAL *et al.*, 2000), dengue (HUNSPERBERGER *et al.*, 2009), sífilis (MEYER *et al.*, 1992). A presença de FR interfere na detecção de IgM, sendo um grande impecílio para o diagnóstico de fase aguda de tais doenças. Outros autores descreveram a presença de anticorpos que apresentam “*cross-reactive idiotypes*”, ou seja, que reagem com sítios antigênicos de epítomos não relacionados (KAROL *et al.*, 1978).

Anticorpos do isotipo IgA exercem função de fundamental importância na defesa imunológica das mucosas (SCHWERER *et al.*, 1989). Devido à sua estrutura polimérica, ela possui facilidade em agregar microrganismos e, além disso pode-se associar a outras estruturas, como mucinas, lactoferrina, entre outros. Na circulação sistêmica, sua estrutura é essencialmente monomérica e não ativa Complemento (MIYAKE *et al.*, 2003). Dessa forma, seu papel nessas circunstâncias é pouco conhecido.

Na realidade, anticorpos séricos do isotipo IgA têm sido empregados como marcadores de diagnóstico, uma vez que parecem estar presente em fase aguda de

algumas doenças infecciosas. Na leptospirose, o teste para detecção de IgA parece apresentar uma sensibilidade diagnóstica acima de 90% (SILVA E CAMARGO, 1992). Na toxoplasmose, sua detecção é mais precoce que IgM (TAKAHASHI, ROSSI, 1994), assim como na dengue (TALARMIN *et al.*, 1998; NAWA *et al.*, 2005; DE DECKER *et al.*, 2015). No caso da hanseníase, CHUJOR *et al.* (1991) já haviam sugerido o uso de IgA como um biomarcador para a detecção precoce da doença, sendo que a subclasse IgA 1 poderia estar associada com a carga bacteriana (SCHWERER., *et al.* 1989; CHUJOR., *et al.*, 1991). Como IgA pode aparecer de forma precoce e apresenta boa correlação com IgM e IgG, um contato de paciente com hanseníase que apresenta positividade de anticorpos IgA anti-PGL-1 poderia indicar um risco aumentado de desenvolvimento da doença. Dessa forma, consideramos que tal isotipo pudesse ser usado como um biomarcador adjuvante em estudos soropidemiológicos de contatos de casos índices de hanseníase em municípios endêmicos e hiperendêmicos (MACEDO *et al.*, 2017).

Dados de outros autores (SILVA *et al.*, 2021) corroboraram com nossos resultados, demonstrando que IgA sérica é um biomarcador que deve ser utilizado em seguimento de contatos, bem como pode auxiliar no diagnóstico da hanseníase. Segundo os autores, o teste de IgA anti-NDO-HSA (*natural octyl disaccharide* conjugado a albumina sérica humana) apresentou uma sensibilidade diagnóstica de 100% para a forma multibacilar da hanseníase e 95% para a forma paucibacilar.

Hungria *et al.* (2012) sugerem que anticorpos do isotipo IgG contra antígenos de *M. leprae* são importantes marcadores para a infecção em estágios iniciais. Em um dos nossos primeiros trabalhos de investigação da IgG em contatos (CABRAL *et al.*, 2013), observamos uma boa correlação entre IgG anti-PGL-1 em casos e seus contatos. Verificamos, na ocasião que 58% dos contatos soronegativos para IgG apresentavam positividade para IgM, enquanto aqueles que eram soropositivos para IgG, 74% apresentavam positividade para IgM. Dois questionamentos surgiram a partir de tais dados, ou seja, estávamos diante de uma baixa sensibilidade diagnóstica para IgG e uma baixa especificidade diagnóstica para IgM.

Realizamos recentemente um estudo prospectivo de 3 anos, avaliando anualmente contatos de pacientes com hanseníase entre 4 e 15 anos de idade no município de Santana do Ipanema, AL (NAGAO-DIAS *et al.*, 2019). No estudo, o teste de IgG anti-PGL-1 foi considerado o melhor biomarcador, sendo que sua presença representou um risco de 8,5 vezes de associação com hanseníase. Ainda no mesmo

estudo, ocorreu um fato. Um contato peridomiciliar foi soropositivo para IgA anti-PGL-1 em 2015. Em 2016, ele apresentou positividade para IgG e IgA anti-PGL-1. Entretanto, a criança não apresentava qualquer lesão. Em 2017, apresentou positividade para IgG, IgA e IgM anti-PGL-1. Verificou-se uma pequena lesão hipocrômica com alopecia no pescoço. O diagnóstico foi dado pela dermatologista da nossa equipe como hanseníase indeterminada. Seus pais afirmavam que ela não tinha amizade, proximidade ou parentesco com nenhum caso. A criança havia integrado o estudo por residir em uma distância de 5 casas da residência de um caso de hanseníase (NAGAO-DIAS *et al.*, 2019)

No presente trabalho, realizamos um estudo transversal de contatos entre 4 e 15 anos de idade e casos índices de 4 municípios do Nordeste do Brasil com taxas de detecção de hanseníase altas ou muito alta endemicidade. Nosso objetivo era de avaliar o potencial dos isotipos de anticorpos anti-PGL-1 em auxiliar no diagnóstico de hanseníase. Contatos com suspeita de lesão e/ou espessamento nervoso não foram incluídos no grupo controle saudável para não gerar viés.

Em termos de presença de lesões suspeitas, nenhuma diferença foi encontrada com relação aos níveis de anticorpos. Portanto, não foi possível diferenciar aqueles que apresentaram lesões suspeitas e aqueles que não apresentaram lesões em termos de isotipos de anticorpos. Quanto aos casos multibacilares, estes apresentaram níveis significativamente mais elevados do que os contatos para todos os isotipos, já com relação aos casos paucibacilares, estes apresentaram títulos mais elevados do que os contatos apenas com relação a IgA anti-PGL-1.

Não observamos associação significativa entre positividade de anti-PGL1 e casos paucibacilares, para nenhum dos isotipos. No entanto, uma forte associação foi encontrada, quando foram avaliados os casos multibacilares e contatos sem lesão (teste de Fisher,  $p \leq 0,0001$ ). Nesta situação, o teste para o isotipo IgM mostrou OR de 6,11, sensibilidade diagnóstica de 76,0 % e especificidade diagnóstica de 65,9%. Isso significa que contatos de casos MB apresentam 6,11 vezes mais chances de desenvolver a doença e que o teste de ELISA IgM anti PGL-1 conseguiu detectar, ou seja, positivar em 76,0% dos casos de hanseníase já diagnosticados.

O teste para o isotipo IgG mostrou OR de 3,31, sensibilidade diagnóstica de 30,0% e especificidade diagnóstica de 88,5%. O teste para o isotipo IgA mostrou OR de 16,97, sensibilidade diagnóstica de 54,0% e especificidade diagnóstica de 93,5%. Comparando o desempenho dos três isotipos, podemos ver que o teste que apresentou

melhor sensibilidade diagnóstica foi IgM, aquele que apresentou melhor especificidade diagnóstica foi IgA. O isotipo IgA foi aquele que apresentou o melhor OR, ou seja, de 16,97. Procuramos ainda avaliar a presença conjunta de dois ou mais isotipos, ou seja, IgM + um ou mais isotipo e IgG + IgA. Considerando IgM + 1 isotipo, a sensibilidade diagnóstica foi de 54,0%, especificidade diagnóstica de 94,7% e OR de 21,0, com intervalo de confiança 95% entre 10,11 e 43,64. No que tange, IgG + IgA, a sensibilidade diagnóstica foi de 24,0%, a especificidade diagnóstica de 98,2% e OR de 17,58. Levando-se em consideração as análises, pudemos verificar que a presença conjunta entre o isotipo IgM mais um isotipo está fortemente associado com os casos multibacilares, pois a razão de um caso multibacilar vir a apresentar o conjunto (IgM acrescido de um ou mais isotipo) é de 21,0 vezes comparativamente a um controle saudável. Em relação aos valores preditivos positivos presumidos, o menor valor foi obtido para IgM, de 24,7% (IC95% 18,1 - 32,3), e os maiores valores foram observados para IgM associado a um ou mais isotipos, ou seja, de 60,0% (IC95% 44,3 - 74,3). Dessa forma, isto nos leva a refletir se um contato apresentar a presença associada de IgM mais um isotipo, não estará tal contato em elevado risco de apresentar hanseníase? Por outro lado, um indivíduo com suspeição de hanseníase e apresentar IgM + um ou mais isotipos, não será um possível caso?

Resumindo, isto sugere que este conjunto constitui uma ferramenta de potencial auxílio para realização de um diagnóstico precoce e como marcador de risco. Diagnóstico precoce significa menor grau de incapacidade 2, menor comprometimento do nervo, menor frequência de reações hansênicas, melhor qualidade de vida e menos gastos para a saúde pública.

## 8 CONCLUSÕES

- Os casos índices eram compostos por 71 participantes na faixa etária 10 a 97 anos, sendo a maioria do sexo masculino (57,7%) e da forma multibacilar (70,4%). Considerando que não foram encontradas informações sobre o tratamento em 10 fichas de 10 pacientes, 43 em 61 casos (70,4%) já haviam completado o tratamento, no entanto, não se observou diferença estatisticamente significativa quanto aos níveis de anticorpos em relação aos que não haviam sido tratados ou que ainda se encontravam em tratamento.
- Os contatos (n=395) apresentaram uma mediana de idade de 10 anos, eram contatos de casos multibacilares (71,0%) e peridomiciliares (78,0%).
- Cinquenta e cinco participantes (13,9%) apresentaram lesões suspeitas e/ou espessamento de nervos, no entanto, apenas 27 foram avaliadas por um profissional médico, sendo que 7 tiveram o diagnóstico de hanseníase, tendo sido 6 com a forma indeterminada e 1 com a forma dimorfa.
- Quanto aos casos multibacilares, estes apresentaram níveis significativamente mais elevados do que os contatos para todos os isotipos, já com relação aos casos paucibacilares, estes apresentaram títulos mais elevados do que os contatos apenas com relação a IgA anti-PGL-1.
- Uma forte associação foi encontrada entre positividade de anticorpos e casos multibacilares, sendo que a melhor OR encontrada foi para IgA (16,97), comparativamente a IgG (3,31) e a IgM (6,11). No entanto, quando se avaliou a presença conjunta de IgM associada a um ou mais isotipos, a OR foi de 21,0.
- A sensibilidade diagnóstica de 76,0% foi observada para IgM, de 30,0% para IgG, 54,0% para IgA e o mesmo valor para IgM associado a um ou mais isotipos. Em relação aos valores preditivos positivos presumidos, o menor valor foi obtido para IgM, de 24,7%, e os maiores valores foram observados para IgM associado a um ou mais isotipos, ou seja, de 60,0% e para os isotipos IgG+IgA, ou seja, de 66,7% (IC95% 41,0- 86,7), respectivamente.

## REFERÊNCIAS

ALAGOAS. Secretaria de Estado da Saúde de Alagoas – SESAU. Saúde Alagoas: **Análise da Situação de Saúde 2017**.

ALAGOAS- <https://www.agenciatatu.com.br/noticia/alagoas-registrou-3348-casos-de-hanseníase-nos-ultimos-dez-anos/> + planilha dados alagoas.

ALENCAR, Carlos Henrique Morais de et al. **Diagnóstico da hanseníase fora do município de residência: uma abordagem espacial, 2001 a 2009**. Cadernos de Saúde Pública, v. 28, p. 1685-1698, 2012.

ALVES, Alexandre Rodrigues. **Deteção de anticorpos séricos e salivares anti-antígeno glicofenólico de Mycobacterium leprae em residentes de localidades do município de Itaitinga, CE**. 2014.

ARAÚJO, Marcelo Grossi **Leprosy in Brazil**. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v. 36, n.3, p-373-382, jun. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000300010>.

ARAÚJO, Sérgio et al. **Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 107, p. 55-59, 2012.

ARAUJO, Sérgio, 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**. Rev Soc Bras Med Trop, v. 48, n. 6, p. 739-745, dez. 2015.

ARAÚJO, Rose Mary da Silva et al. **Análise do perfil epidemiológico da hanseníase**. Rev. enferm. UFPE on line, p. 3632-3641, 2017.

AROCHA, F. et al. **Anticuerpos séricos antiglicolípido fenólico 1 en personal de centros de salud en contacto con pacientes con enfermedad de Hansen**. Kasmera, Maracaibo, v. 34, n. 2, p. 102-113, dez. 2006.

ATTIA, E. A. S. et al. **Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating CD4+ CD25 high FoxP3+ T-reg cells, as well as down regulatory cytokines**. Archives of dermatological research, v. 306, n. 9, p. 793-801, 2014.

BARRETO, Josafá Gonçalves et al. **Anti-PGL-1 seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon**. Lepr Rev. v.82, n.4, p. 358–370, dez. 2011

BARRETO, Jaison A et al. **Diagnóstico laboratorial da Hanseníase: indicações e limitações**. Hanseníase: avanços e desafios. Brasília, DF: NESPROM, p. 131-40, 2014.

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

BARRETO, Josafá Gonçalves 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.

BARRETO, Josafá Gonçalves et al. **Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy.** BMC infectious diseases, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2015.

BARRETO, Josafá Gonçalves et al. **Leprosy in Children.** Curr Infect Dis Rep, v.19, n. 23, p. 1-8, jun, 2017. <http://dx.doi.org/10.1007/s11908-017-0577-6>.

BAZAN-FURINI, Renata et al. **Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 106, n. 5, p. 536- 40, ago, 2011.

BLUTT, Sarah E et al. **IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection.** Mucosal Immunol, v. 5, n. 6, p. 712-719. 2012

BOGLIOLO L. **Patologia.** 5th ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan; 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde/Secretária de Vigilância em Saúde/departamento de vigilância epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase.** 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 149, de 3 de fevereiro de 2016.** Diretrizes para Vigilância, Atenção e Eliminação da Hanseníase como Problema de Saúde Pública. 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia Prático Sobre a Hanseníase.** 1ª edição. Brasília, DF. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico.** Brasília, DF, v. 49. n4, 2018. Disponível:<http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/31/2018-004-Hansenise-publicacao.pdf>. Acesso: 15 de dezembro 2021

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Boletim Epidemiológico-Hanseníase.** 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico: Hanseníase.** Brasília, DF, n. Especial, 2021a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Teste de detecção molecular qualitativa do Mycobacterium leprae para o diagnóstico de hanseníase.** Brasília. 2021b. Disponível:[http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20211119\\_Relatorio\\_teste\\_molecular\\_hansenise\\_CP98.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2021/20211119_Relatorio_teste_molecular_hansenise_CP98.pdf) Acesso em: 20 de novembro 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde 5º edição.** Brasília DF. 2021c.



BRENNAN PJ, BARROW WW. **Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae***. Int J Lepr Other Mycobact Dis, v. 48, n. 4, p. 382-387, dez. 1980.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. J. **Leprosy**. The Lancet, [S.L.], v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, abr. 2004.

BÜHRER-SÉKULA, Samira et al. **Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy**. J Clin Microbiol, v 41, n. 5, p. 1991-5, 2003

BÜHRER-SÉKULA, Samira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 3-5, 2008.

CABRAL, Paula Brito et al. **Anti-PGL-1 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.

CALADO, Karla Lucena Sampaio 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.

CAVALIERE, Ivonete Alves de Lima; COSTA, Suely Gomes. **Isolamento social, sociabilidades e redes sociais de cuidados**. Physis: revista de saude coletiva, v. 21, p. 491-516, 2011.

CEARÁ. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará (CE). **Boletim epidemiológico: Hanseníase**. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. **DPDx- laboratory identification of parasitic diseases of public health concern**. Atlanta (GA): US Department of Health and Human Services, 2017.

CHAPTINI, Casandra , MARSHMAN Gillian. **Leprosy: a review on elimination, reducing the disease burden, and future research**. Lepr Rev, v 86 n. 4, p. 307-315, dez. 2015.

CHEN, Xin; OPPENHEIM, Joost J. **Th17 cells and Tregs: unlikely allies**. Journal of leukocyte biology, v. 95, n. 5, p. 723-731, 2014.

CHUJOR, C. S. et al. **Serum IgA1 and IgM antibodies against *Mycobacterium leprae*-derived phenolic glycolipid-I: a comparative study in leprosy patients and their contacts**. International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association, v. 59, n. 3, p. 441-449, 1991.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioural sciences**. New York: Academic Press, 1969.

CUNHA, Maria Heliana Chaves Monteiro da et al. **Perfil de anticorpos anti-PGL-1 em indivíduos sadios de áreas endêmicas para a hanseníase do Estado do Pará, Brasil.** 2012.

CUNHA, Vivian da Silva. **Isolated 'like us' or isolated 'among us'? : the controversy within the National Academy of Medicine over compulsory isolation of leprosy sufferers.** *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, v. 17, n. 4, p. 939-954, 2010.

DA SILVA, Moises B et al. **Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 12, n. 6, p. e0006532, jun. 2018. doi:10.1371/journal.pntd.0006532

DE DECKER, Sophie et al. **Evaluation of the diagnostic accuracy of a new dengue IgA capture assay (Platelia Dengue IgA Capture, Bio-Rad) for dengue infection detection.** *PLoS Negl Trop Dis*, v. 9, n. 3, p. e0003596, 2015.

DE LIMA SILVEIRA, Edvaldo et al. **New immunologic pathways in the pathogenesis of leprosy: role for Th22 cytokines in the polar forms of the disease.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 72, n. 4, p. 729-730, 2015.

DE MACEDO, Alexandre C. et al. **Serum anti-phenolic glycolipid—1 IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys?.** *Journal of clinical laboratory analysis*, v. 32, n. 3, p. e22276, 2017.

DEPARTAMENTO DE DOENÇAS DE CONDIÇÕES CRÔNICAS E INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (DCCI). **Indicadores e Dados Básicos de Hanseníase nos Municípios Brasileiros.** Disponível em: <<http://indicadoreshanseniaze.aids.gov.br/>>. Acesso em: 12 de dezembro de 2021

DA SILVA, Moises B. et al. **Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 12, n. 6, p. e0006532, 2018.

DELFORGE ML. **De l'utilité ou non de la sérologie infectieuse: morceaux choisis [On the usefulness of serology testing in infectious diseases: selected topics].** *Rev Med Brux.*, v. 32, n. 4, p. 285-288, 2011.

DE SOUSA, Jorge Rodrigues et al. **Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions.** *BMC infectious diseases*, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018.

DE SOUSA, Jorge Rodrigues et al. **Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease,** v. 8, p. 1635, 2017

DE SOUSA AARÃO, Tinara Leila et al. **Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy.** *Microbial pathogenesis*, v. 90, p. 64-68, 2016.

DE SOUZA, Vania Nieto Brito et al. **Advances in leprosy immunology and the field application: a gap to bridge.** Clinics in dermatology, v. 34, n. 1, p. 82-95, 2016.

DE SOUZA VALOIS, Elderson Mariano; CAMPOS, Franciely Maria Carrijo; IGNOTTI, Eliane. **Prevalence of Mycobacterium leprae in the environment: A review.** African Journal of Microbiology Research, v. 9, n. 40, p. 2103-2110, 2015.

DOUGLAS, J. T. et al. **Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts.** Clinical and Vaccine Immunology, v. 11, n. 5, p. 897-900, 2004.

EIDT, Letícia Maria. **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, n. 2, p. 76-88, 2004.

FAUL F, Erdfelder E, Lang A-G, Buchner A G\*Power 3: **A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences.** Behav Res Methods, v. 39, p. 175–191, 2007. <https://doi.org/10.3758/BF03193146>

FLAGEUL, Béatrice. **Le diagnostic de la lèpre.** Revue Francophone des Laboratoires, v. 2011, n. 431, p. 37-42, 2011.

FREITAS BH et al. Tendência da hanseníase em menores de 15 anos em Mato Grosso (Brasil), 2001-2013. Rev Saude Publ, v. 51, n. 28, 2017

FROES JR, Luis Alberto Ribeiro; TRINDADE, Maria Angela Bianconcini; SOTTO, Mirian Nacagami. Immunology of leprosy. International Reviews of Immunology, p. 1-21, 2020.

GÓMEZ, Libardo et al. **Factors associated with the delay of diagnosis of leprosy in north-eastern Colombia: a quantitative analysis.** Tropical Medicine & International Health, v. 23, n. 2, p. 193-198, 2018.

GOULART, Isabela Maria Bernardes; PENNA, Gerson Oliveira; CUNHA, Gabriel. **Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 35, n. 4, p. 363-375, 2002.

HARRINGTON, Laurie E.; MANGAN, Paul R.; WEAVER, Casey T. **Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage.** Current opinion in immunology, v. 18, n. 3, p. 349-356, 2006.

HENRY, Mary et al. **Factors Contributing to the Delay in Diagnosis and Continued Transmission of Leprosy in Brazil-An Explorative, Quantitative, Questionnaire Based Study.** PLoS Negl Trop Dis, mar. 2016. e0004542. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004542>

HIRAI, Kelly Emi et al. **Langerhans cells (CD1a and CD207), dermal dendrocytes (FXIIIa) and plasmacytoid dendritic cells (CD123) in skin lesions of leprosy patients.** *Microbial pathogenesis*, v. 91, p. 18-25, 2016.

HUNSPERGER, Elizabeth A. et al. **Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests.** *Emerging infectious diseases*, v. 15, n. 3, p. 436, 2009.

HUNGRIA, E. M. et al. **Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, [S.L.], v. 107, n. 1, p. 104-111, dez. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762012000900017>

HUNTER, Shirley W.; BRENNAN, Patrick 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.

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ. **Kit NAT Hanseníase IU-IVD-006**, 2021. Disponível em: <https://www.ibmp.org.br/pt-br/wp-content/uploads/2021/05/Instru%C3%A7%C3%A3o-de-Uso-KIT-NAT-Hansen%C3%ADase.pdf>. Acesso em 03 jan 2022

IQBAL, Javed; SHER, A.; RAB, A. **Plasmodium falciparum histidine-rich protein 2-based immunocapture diagnostic assay for malaria: cross-reactivity with rheumatoid factors.** *Journal of clinical microbiology*, v. 38, n. 3, p. 1184-1186, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/> Acesso em 03 mai 2021

INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONOMIXCA DO CEARÁ (IPECE). Disponível em: <http://ipecedata.ipece.ce.gov.br/ipece-data-web/module/perfil-municipal.xhtml>. Acesso em 03 mai 2021

KAMPIRAPAP K, SINGTHARN N. **Anti-PGL- 1 antibody levels in Thai leprosy patients.** *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 27, n. 4, p. 728-33, dez. 1996.

KANG, Tae Jin; LEE, Seong-Beom; CHAE, Gue-Tae. **A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy.** *Cytokine*, v. 20, n. 2, p. 56-62, 2002.

KAROL, Robin et al. **Idiotypic cross-reactivity Between antibodies of different specificities.** *J Exp Med*, v. 148, n. 1, p. 1488-1497, dez. 1978.

KIBBIE, Jon et al. **Jagged1 instructs macrophage differentiation in leprosy.** *PLoS pathogens*, v. 12, n. 8, p. e1005808, 2016.

KRUTZIK, Stephan R. et al. **TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells.** *Nature medicine*, v. 11, n. 6, p. 653-660, 2005.

KUMAR, Sudhir et al. **CD4+ CD25+ T regs with acetylated FoxP3 are associated with immune suppression in human leprosy.** *Molecular immunology*, v. 56, n. 4, p. 513-520, 2013.

LAMM, Michael E. **The IgA mucosal immune system.** *Am J Kidney Dis* v. 12, n, p. 384-387, nov.1988.

LANA, Francisco Carlos Felix et al. **Deformities due to Leprosy in Children under Fifteen Years Old as an Indicator of Quality of the Leprosy Control Programme in Brazilian Municipalities.** *J Trop Med*, v. 2013 p. 812793, mar 2013  
doi:10.1155/2013/812793 2013;2013:812793.

LASTÓRIA JC, MACHARELLI CA, PUTINATTI MSMA. **Hanseníase: realidade no seu diagnóstico clínico.** *Hansen Int*, v. 28, n. 1, p. 53-58, 2003.

LETURIONDO, André Luiz et al. **Performance of serological tests PGL-1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil.** *BMC Infect Dis*, v 19, n. 1, jan. 2019. doi: 10.1186 / s12879-018-3653-0.

LIMA, R. S. K. *et al.* **A importância da busca ativa como estratégia de controle da hanseníase em territórios endêmicos.** *Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas*, [S. L.], v. 41 (1-2), p. 55-63, 2016.

LOBATO, Janaina et al. **Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection.** *Leprosy review*, v. 82, n. 4, p. 389, 2011.

LYON, Sandra et al. **A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil.** *Lepr Rev.* v. 79, n. 2, p. 162-70, 2008.

LYON, Sandra; GROSSI, Maria Aparecida de Faria. **Diagnóstico e tratamento da hanseníase. In: Hanseníase avanços e desafios.** 2014. p. 141-169.

LYON, S.; LYON-MOREIRA, H. **Marcadores biológicos na hanseníase.** Lyon S, Grossi MAF. *Hanseníase*, Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

MACIEIRA, Suzana. **Aspectos microbiológicos do Mycobacterium leprae.** *Noções de Hansenologia.* Centro de Estudos “Dr. Reynaldo Quagliato”: Bauru, 2000.

MANTIS NJ, et al. **Secretory IgA’s Complex Roles in Immunity and Mucosal Homeostasis in the Gut.** *Mucosal immunology*, v. 4, n. 6, p. 603-611, nov. 2011.

MARTINEZ, TS et al. **Mucosa Oral como fonte de infecção e transmissão do Mycobacterium leprae e implicações na detecção do DNA bacteriano e do estado imunológico,** v. 17, n. 11, p. 1653-1658, nov. 2011.

MENEZES M. **Fiocruz cria teste molecular para hanseníase inédito no Brasil.** Em: <https://portal.fiocruz.br/noticia/fiocruz-cria-teste-molecular>. Acesso em 12/11/2021.

- MEYER M.P.; RODITI D.; LOUW S. **IgM rheumatoid factor removal and performance of the FTA-ABS (IgM) test in congenital syphilis.** Genitourin Med. 1992 Aug; 68(4): 249–253. doi: 10.1136/sti.68.4.249
- MI, Zihao, et al. **Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy**, v 11, n. 597, abr. 2020;11:567. doi:10.3389/fimmu.2020.00567
- MOET FJ et al. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. J Infect Dis, v. 193, p. 346- 53.2006
- MONOT M, HONORE N, GARNIER T, et al. **Análise comparativa genômica e filogeográfica do Mycobacterium leprae.** Nature Genetics, v. 41, p. 1282–89, 2009.
- MONTOYA, Dennis J. et al. **Dual RNA-Seq of human leprosy lesions identifies bacterial determinants linked to host immune response.** Cell reports, v. 26, n. 13, p. 3574-3585. e3, 2019.
- MONTEIRO, Lorana Dias et al. **Spatial patterns of leprosy in a hyperendemic state in Northern Brazil, 2001-2012.** Rev Saude Publica. v. 49, n. 84, 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0034-8910.2015049005866>
- MOURA, Maria L. N. *et al.* **Active Surveillance of Hansen's Disease (Leprosy): Importance for Case Finding among Extra-domiciliary Contacts.** PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 7, n. 3, p. e2093, mar. 2013  
<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002093>
- MIYAKE, Mônica Aidar Menon et al. **Mecanismos imunológicos da mucosa das vias aéreas superiores e fisiopatologia do anel linfático de Waldeyer: conceitos atuais.** Current Concepts, v. 7, n. 2, p. 143-150, jun. 2003.
- NAGAO, Aparecida Tiemi et al. **Elevated levels and different repertoire profile of colostral anti-LPS antibodies may have a significant role in compensating newborn immunity.** Scand J Immunol, v. 53, n. 6, p. 602-609, jun. 2001.
- NAGAO-DIAS, Aparecida Tiemi 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.** Braz J Infect Dis. v.11, n. 12, p.215-219, abr. 2007
- NAGAO-DIAS, Aparecida Tiemi et al. **Serum Anti-PGL-1 IgG, IgM, and IgA in a 3-Year Follow-up Study of 4–15-Year-old Leprosy Contacts.** The Pediatric infectious disease journal, v. 38, n. 9, p. e193-e198, 2019.
- NATH, Indira; SAINI, Chaman; VALLURI, Vijaya Lakshmi. **Immunology of leprosy and diagnostic challenges.** Clinics in Dermatology, v. 33, n. 1, p. 90-98, 2015.
- NAOT, Yehudith, et al. **IgM enzyme-linked Immunosorbent assay test for the diagnosis of congenital Toxoplasma infection.** J Pediatric, v.98, n.1, p. 32-36, 1981.

NAWA M, et al. **Immunoglobulin A antibody responses in dengue patients: a useful marker for serodiagnosis of dengue virus infection.** Clin Diagn Lab Immunol v. 12, n. p.1235-1237, 2005.

NIITSUMA, Eyleen Nabyla Alvarenga, et al, **Fatores associados ao adoecimento por hanseníase em contatos: revisão sistemática e metanálise.** Rev bras epidemiol 2021; 24: e210039. <https://doi.org/10.1590/1980-549720210039>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Department of Control of Neglected Tropical Diseases.** Global leprosy update, 2017: Reducing the disease burden due to leprosy. Genebra, v. 93, n. 35, p. 445-456, ago. 2018. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/274290>>. Acesso em: 17 mar. 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. **Rumo à hanseníase zero. Estratégia Global para Hanseníase (Doença de Hansen) 2021-2030. Sudeste da África 2021.** Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/340774>>. Acesso em: 18 mar. 2021

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. **Global Leprosy Strategy 2016–2020: Accelerating towards a leprosy-free world.** New Delhi (India): World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. **Study Group. Chemotherapy of leprosy for control programmes.** Geneve: WHO; 1982. p. 675. [WHO Technical Report Serie].

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL SAÚDE. **Guideline da WHO para Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Hanseníase 2019.** Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leprosy - Number of new leprosy cases with G2D among children (less than 15 years of age). 2021.** Disponível em: [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/leprosy---number-of-new-child-\(less-than-15-years-of-age\)-cases-detected-with-g2d](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/leprosy---number-of-new-child-(less-than-15-years-of-age)-cases-detected-with-g2d). Acesso em: 28 nov. 2021a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Towards zero leprosy. Global Leprosy (Hansen's Disease) Strategy 2021– 2030, 2021b** [Acesso 26 maio 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340774>

PALERMO, Maria L. et al. **Increased expression of regulatory T cells and down-regulatory molecules in lepromatous leprosy.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 86, n. 5, p. 878-883, 2012.

PENNA, Maria Lucia 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.

PIERNEEF L, et al. **Detection of anti-M. leprae antibodies in children in leprosyendemic areas: A systematic review.** PLoS Negl Trop Dis, v.15, n. 8, p. e000966, 2021 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009667>

RIBEIRO, Gabriela de Cássia et al. **Uso combinado de marcadores sorológicos e análise espacial na vigilância epidemiológica da hanseníase.** Revista Pan-americana de Saúde Pública. v.45 p. e129. nov. 2021. doi: 10.26633 / RPSP.2021.129

RICHARDUS, Renate A. et al. **Longitudinal assessment of anti-PGL-1 serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh.** PLoS neglected tropical diseases, v. 11, n. 12, p. e0006083, 2017.

RIDÉY, D. S. et al. **Classification of leprosy according to immunity. A five-group system.** International journal of leprosy, v. 34, n. 3, p. 255-73, 1966.  
Rodrigues Júnior IA, Gresta LT. **Testes de sensibilidade cutânea.** In: Lyon S, Grossi MAF. **Hanseníase.** Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

RODRIGUES, Laura C.; LOCKWOOD, Diana NJ. **Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps.** The Lancet infectious diseases, v. 11, n. 6, p. 464-470, 2011.

RODRIGUES, Mecciene Mendes et al. **Hanseníase in Dermatologia: do Nacer ao Envelhecer.** Rodrigues MM. 1a ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2012.

ROMANHOLO, Helizandra Simoneti Bianchini et al. **Surveillance of intradomiciliary contacts of leprosy cases: perspective of the client in a hyperendemic municipality.** Revista brasileira de enfermagem, v. 71, n. 1, p. 163-169, 2018.

ROMERO-MONTOYA, Irma Marcela et al. **Leprosy in Colombian children and adolescents.** The Pediatric infectious disease journal. vol. 33, n. p. 321-2 mar. 2014.  
<http://dx.doi.org/10.1097/INF.0000000000000057>.

SAGICA, T. P. et al. **Avaliação dermatoneurológica e sorológica em contatos de hanseníase menores de quinze anos de área endêmica.** Hansenologia Internationalis: hanseníase e outras doenças infecciosas, 43, p. 1-12, set. 2020.

SALA DE APOIO À GESTÃO ESTRATÉGICA (SAGE). Disponível em:  
<<https://sage.saude.gov.br/>>. Acesso em: 20 mar. 2021.

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

SARNO E N, et al. **Leprosy exposure, infection and disease: a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts.** Mem Inst Oswaldo Cruz, v 107, n. 8, p. 1054-9, 2012 doi: 10.1590/S0074-02762012000800015

SARUBI, Juliana Cunha; MARCELLO JÚNIOR, Hylló Baeta. **Baciloscopia.** In: **Hanseníase.** 2013. p. 105-116.

SCHNEIDER, Priscila Barros; FREITAS, Bruna Hinnah Borges Martins de. **Tendência da hanseníase em menores de 15 anos no Brasil, 2001-2016.** Cadernos de Saúde Pública, v. 34, p. e00101817, 2018.



SCHEELBEEK PFD, et al. **Um Estudo Retrospectivo da Epidemiologia da Hanseníase em Cebu: Um Perfil de Onze Anos.** PLoS Negl Trop Dis, v.7, n. 9, p. e2444, 2013 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000244>

SCHWERER, Beatrix 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.

SCOLLARD, David M. et al. **The continuing challenges of leprosy.** Clinical microbiology reviews, v. 19, n. 2, p. 338-381, 2006.

SILVA Marcos Vinicius et al. **Teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos circulantes da classe IgA na leptospirose humana.** Rev. Inst. Med. Trop, v 30, n.2, p.239-1992.

SILVA, Kissia Karen Paiva E et al. **Serum IgA Antibodies Specific to M. leprae Antigens as Biomarkers for Leprosy Detection and Household Contact Tracking.** Front Med (Lausanne), v. 8, ago. 2021. doi: 10.3389/fmed.2021.698495

SMART, Joanne M, KEMP Andrew S. **Ontogeny of T-helper 1 and T-helper 2 cytokine production in childhood.** Pediatr Allergy Immunol, v. 12, n. 4, p. 181-187, ago. 2001.

SMITH WC, Aerts A. **Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption 382 of leprosy transmission.** Lepr Rev, v 85, n. 1, p. 2-17, mar. 2014.

SOUZA, Cacilda Silva. **Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial.** Medicina (Ribeirão Preto), v. 30, n. 3, p. 325-334, 1997.

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

SPIERINGS, Eric et al. **Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy.** The Journal of Immunology, v. 166, n. 10, p. 5883-5888, 2001.

STAFIN I.; GUEDES V. R.; MENDES S. U. R. **Diagnóstico precoce de Hanseníase e ações estratégicas para a sua detecção.** Revista de Patologia do Tocantins, 5, 2, p. 67-73, 2018.

SUZUKI, Koichi et al. **Current status of leprosy: epidemiology, basic science and clinical perspectives.** The Journal of dermatology, v. 39, n. 2, p. 121-129, 2012.

TALARMIN A, Labeau B, Lelarge J. **Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever.** J Clin Microbiol, v. 36, n. 5, p. 1189-1192, mai. 1998

TALHARI S et al. **Hanseníase , 5th edition** , Rio de Janeiro: DiLivros 2015

TAKAHASHI E E, ROSSI CL. **Use of three immunological techniques for the detection of Toxoplasma sp. IgA antibodies in acute toxoplasmosis.** J Clin Pathol, v. 47, p. 1101-1104, 1994

TORRES, Reginaldo Thuler et al. **Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: a systematic review and meta-analysis.** Diagn Microbiol Infect Dis, v. 100, n. 2, p. 115337, jun. 2021. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115337

VAN HOOIJ, Anouk et al. **Field-friendly serological tests for determination of M. leprae-specific antibodies.** Sci Rep, v 7, n 1, p. 8868, 2017.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07803-7> PMID: 28827673

VAN HOOIJ, Anouk, GELUK, Annemieke. **In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to Mycobacterium leprae.** Immunol Rev. v. 301, n. 1, p. 175-192, mar. 2021.

YAGHOUBI, Reza et al. **Lepromatous leprosy: a commonly misdiagnosed disease.** Scientific World Journal, v. 10, p. 2348-9, dez. 2010;10:2348-9.  
doi:10.1100/tsw.2010.206

YAMAMURA, Masahiro et al. **Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions.** Science, v. 254, n. 5029, p. 277-279, 1991.

WANG, Na *et al.* **The role of an active surveillance strategy of targeting household and neighborhood contacts related to leprosy cases released from treatment in a low-endemic area of China.** PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 14, n.8, p. e0008563, ago, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008563>

WEST, Rachel. **Serology and Other Adaptive Immune Response Testing for COVID-19.** The Johns Hopkins University, p. 1-4, abr. 2021.  
Disponível em: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact423sheets/200228-Serology-testing-COVID.pdf>. Acesso em: 26 outubro de 2021.

ZENHA E M, FERREIRA M A, FOSS N T. **Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients.** Braz J Med Biol Re v. 42, n. 10, p. 968-972, out, 2009.

**APÊNDICE A – INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS**  
**QUESTIONÁRIO DO CASO ÍNDICE**

1. Data da entrevista:		2. Entrevistador:	
3. Nome caso índice:		4. Data nascimento:	
5. Sexo	( ) Mas. ( ) Fem.	6. Classificação operacional	( ) Paucibacilar ( ) Multibacilar
7. Forma clínica:		8. Índice Baciloscópico:	( ) Positivo ( ) Negativo ( ) Não realizada
9. Data diagnóstico doença:		10. Realizou tratamento:	( ) Sim ( ) Não
11. Tempo duração tratamento:		12. Data início tratamento:	
13. Esquema terapêutico:	( ) PQT/ 6 doses ( ) PQT/ 12 doses ( ) Outro	14. Completou tratamento:	( ) Sim ( ) Não
15. Rua/ número:		16. Bairro:	
17. Município:		18. Estado:	
19. Telefone contato:			
<b>Contatos do caso índice (de 4 a 15 anos de idade)</b>			
Nome	Data de nascimento	Sexo	Tipo de contato

**QUESTIONÁRIO DO CONTATO**

- Endereço do contato: \_\_\_\_\_
- Telefone: \_\_\_\_\_
- Cidade-Estado: \_\_\_\_\_
- Tipo de contato: Intradomiciliar (  ) Peridomiciliar (  )
- Identificação do caso índice: \_\_\_\_\_
- Forma clínica do caso índice: \_\_\_\_\_
- Distância em número de casas (ou em metros) do caso índice (se contato peridomiciliar): \_\_\_\_\_
- Nome do entrevistador: \_\_\_\_\_
- Data da entrevista: \_\_\_\_\_

**Contatos que moram na mesma casa (faixa etária de 4 a 15 anos):**

- Nome 1: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_
- Data de nascimento 1: \_\_\_\_\_
- Nome 2: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_
- Data de nascimento 2: \_\_\_\_\_

**Em relação ao caso índice**

1. Você conhece alguém que apresentou ou apresenta hanseníase?

Sim (  ) Não (  )

2. Se sim, tipo de contato com o caso índice:

o Pai ou mãe (  ) Filho ou filha (  )

o Irmão ou irmã (  ) Sobrinho, sobrinha, tio ou tia (  )

o Vizinho (  ) Amigo (  )

o Primo (  ) Neto (  )

3. Frequência de contato:

o Diariamente (  ) Semanalmente (  ) Esporádico (  )

4. Outras observações:

**AVALIAÇÃO DERMATONEUROLÓGICA**

Exame dermatoneurológico

1. CÓDIGO DE CONTATO:

2. Nome do contato:

3. Data de nascimento:

Dados do exame dermatoneurológico dos contatos:

1. Existem Lesões na Pele?

- Sim
- Não
- Se sim, quantos?

2. Como são as lesões?

- Mancha hipocrômica (lesão branca sem relevo)
- Mancha hiperocrômica (lesão com diferentes tons de marrom sem relevo)
- Placa hipocrômica (lesão de pele elevada e esbranquiçada medindo mais de 2 cm de diâmetro)
- Placa hiperocrômica (lesão cutânea elevada com vários tons de marrom, medindo mais de 2 cm de diâmetro)
- Pápula (pequena elevação da superfície que 1 cm)
- Nódulo (nódulo palpável, medindo 1 a 3 cm)
- Infiltração Difusa

3. Há uma mudança na sensibilidade térmica?

- Sim
- Não
- Não conclusivo
- Não avaliado

4. Há alteração na sensibilidade dolorosa?

- Sim
- Não
- Não conclusivo
- Não avaliado

5. Há alteração na sensibilidade tátil?

- Sim
- Não
- Não conclusivo
- Não avaliado

6. Existe alguma alteração no Teste de Histamina Endógena?

- Sim
- Não
- Não conclusivo
- Não avaliado

7. Há alguma alteração no teste de amido-iodo?

- Sim
- Não
- Não conclusivo
- Não avaliado

8. As lesões são sugestivas de hanseníase?

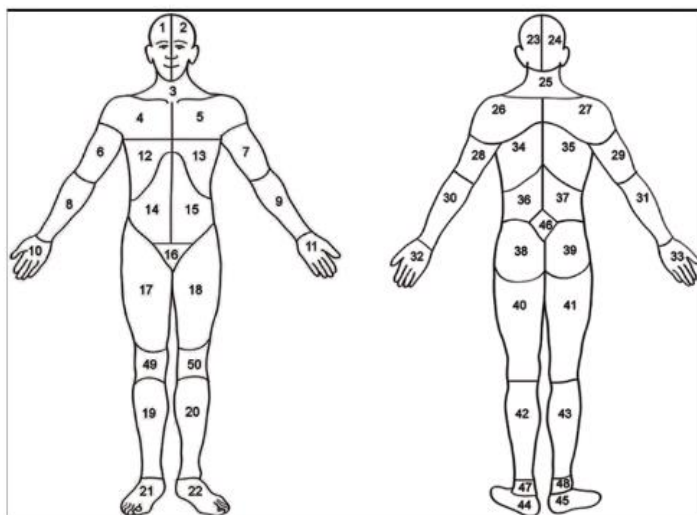
- Sim
- Não
- Se não, como eles se parecem?

9. Existem nervos afetados?

- Sim
- Não
- Não avaliado
- Se sim, quantos?

10. Quais nervos?

- Facial
- Trigêmeo
- Ulnar
- Mediana
- Radial
- Fibular comum
- Tibial posterior
- Outros:



11. Liste as Áreas Suspeitas Identificadas no exame dermatoneurológico, conforme imagem acima:

12. Possui cicatriz BCG?

- Sim
- Não
- Cicatriz duvidosa
- Se sim, quantas?

13. O contato examinado é um caso suspeito de hanseníase?

- Sim
- Não

14. Observações:

## **APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**



## UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, \_\_\_\_\_, aceito que \_\_\_\_\_, menor sob minha responsabilidade, está sendo convidado para participar da pesquisa **Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares**, sobre análise de anticorpos no sangue e na saliva contra a bactéria causadora da hanseníase e verificar se ela está presente na saliva 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). 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) porá 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. Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, será um grande benefício para o menor e para outros jovens e crianças.

Riscos da realização dos testes: Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registros em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de (garrote) e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

#### 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.
- ❖ A qualquer momento você poderá recusar a participação do menor sob sua responsabilidade.
- ❖ Você receberá uma via do TCLE, caso seja desejado.
- ❖ A entrevista será de aproximadamente 15 minutos e conterá 10 perguntas simples.

*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 que o menor sob minha responsabilidade participe 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 85-999618435, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210).

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	

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ, Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Att., CEP/UFC/PROPESQ (85) 33668344/8346

## APÊNDICE C: TERMO DE ASSENTIMENTO PARA SUJEITOS DE 08 A 15 ANOS DE IDADE COMPLETOS



### UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

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

**Título do estudo: Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares.**

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 na saliva e no sangue. Esta análise será realizada anualmente por 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 e dormência. Serão coletados saliva (1 mL) e sangue (2 tubos com 3 mL cada). 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 a 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. Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, será um grande benefício para o menor e para outros jovens e crianças.

**Riscos da realização dos testes:** Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registro em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de (garrote) e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

#### 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.

- ❖ A qualquer momento você poderá recusar sua participação.
- ❖ Você receberá uma via do termo de assentimento, caso seja desejado.
- ❖ A entrevista será de aproximadamente 15 minutos e conterá 10 perguntas simples.

*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 85-999618435, Universidade Federal do Ceará – Rua Capitão Francisco Pedro, 1210).

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		

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ, Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 – Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. Att., CEP/UFC/PROPESQ (85) 33668344/8346

**ANEXO 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA E EMENDA**

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 dermato-neurológico 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

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Detecção precoce de casos de hanseníase entre jovens abaixo de 15 anos de idade através do auxílio de marcadores imunológicos e moleculares

**Pesquisador:** Aparecida Tiemi Nagao Dias

**Área Temática:**

**Versão:** 8

**CAAE:** 11709213.9.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.729.159

#### Apresentação do Projeto:

A referida emenda tem por finalidade a inclusão do município de Canindé, Ceará, no estudo. O projeto foi alterado com a inclusão do município.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo da emenda:

Inclusão do município de Canindé, como mais um local de realização da pesquisa.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados, com registro em seus respectivos conselhos e obedecerão as normas técnicas vigentes de coleta de amostras biológicas. Contudo alguns desconfortos poderão ser sentidos durante a coleta da amostra da mucosa nasal a ser realizada com um cotonete esterilizado (swab). Durante a coleta de sangue, dor leve no momento do procedimento de  $\zeta$ garrote e punção venosa poderá ser sentida. Garantimos que em nenhum momento haverá risco para do participante contaminar-se com qualquer doença.

Benefícios:

Se conseguirmos provar que há uma estreita associação entre a positividade dos parâmetros imunológicos e/ou moleculares e associação com o risco de desenvolvimento da hanseníase, acreditamos que será uma importante contribuição para as políticas públicas de saúde, pois o

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br

Continuação do Parecer: 3.729.159

custo de um paciente diagnosticado tardiamente para o Estado é enorme, além do prejuízo de qualidade de vida que o indivíduo terá de forma permanente. Os parâmetros propostos no presente estudo caso se demonstrem aplicáveis e de significância, o seu conhecimento tecnológico poderá ser repassado para os laboratórios do Estado, como os LACENs.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A referida emenda tem por finalidade a inclusão do município de Canindé, Ceará, no estudo. O projeto foi alterado com a inclusão do município.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi devidamente anexado:

cartacomiteeticanovembro04112019.pdf

projetomodificado01112019.pdf

Cronogramaatualizado01112019.pdf

declaracaocaninde.pdf

cartacomiteeticanovembro20112019.pdf

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

A pesquisadora deve enviar o relatório final ao concluir a pesquisa.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1463694_E3.pdf	20/11/2019 16:53:36		Aceito
Outros	cartacomiteeticanovembro20112019.pdf	20/11/2019 16:52:42	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Outros	cartacomiteeticanovembro04112019.pdf	04/11/2019 11:37:51	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomodificado01112019.pdf	01/11/2019 12:40:44	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Cronograma	Cronogramaatualizado01112019.pdf	01/11/2019 12:40:12	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito
Declaração de Instituição e	declaracaocaninde.pdf	01/11/2019 10:50:05	Aparecida Tiemi Nagao Dias	Aceito

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** comepe@ufc.br



## ANEXO 2

## SORO ANTI-PGL-1 IGG, IGM E IGA EM UM ACOMPANHAMENTO DE 3 ANOS ESTUDO DE CONTATOS COM HANSENÍASE DE 4 A 15 ANOS

## ORIGINAL STUDIES

## Serum Anti-PGL-1 IgG, IgM, and IgA in a 3-Year Follow-up Study of 4–15-Year-old Leprosy Contacts

Aparecida Tiemi Nagao-Dias, PhD,\* Alexandre Casimiro de Macedo, PhD(c),\* Raphael Oliveira Rodrigues, MSc,\* Fernando Henrique De Castro Pedroza, BS,\* Andressa Almeida Albuquerque, BS(c),\* Francisca Aniele Moreira BS,\* Camilla dos Santos Mateus, MSc,\* Clódis Maria Tavares, PhD,† and Thereza Lúcia Prata de Almeida, MD‡

**Background:** In 2015, the detection rate of leprosy in Santana do Ipanema municipality, Alagoas state, Brazil, was 39.3 cases per 100,000 inhabitants, and among young people below 15 years of age, it was 32.8 cases per 100,000 inhabitants.

**Material and methods:** A prospective study was carried out from 2015 to 2017, in Santana do Ipanema city, with 69 leprosy contacts in the age group of 4–15 years. Measurement of serum IgM, IgG, and IgA against phenolic glycolipid antigen-1 (PGL-1) was done by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** A high frequency of positive anti-PGL-1 IgM was found in both paucibacillary and multibacillary contacts. Twenty-three participants presented suspected lesions and 45 did not. In both groups a high frequency of positive IgM was found. In regard to anti-PGL-1 IgG, it was found a strong association between its positivity and the presence of lesions (relative risk of 3.25). Eight new cases of leprosy were diagnosed, five of which were seropositive for anti-PGL-1. Again, a striking association was found between positive IgG and leprosy (relative risk of 8.5). No significant association was found between IgM isotype and disease, nor between IgA and disease.

**Conclusions:** The present study reinforces the importance of measuring the three anti-PGL-1 isotypes in follow-up studies of leprosy contacts. Moreover, positive anti-PGL-1 IgG is associated with a high associated risk of disease.

**Key Words:** leprosy contacts, anti-PGL-1, serum IgA, serum IgG, serum IgM (*Pediatr Infect Dis J* 2019;38:e193–e198)

According to World Health Organization (WHO), 210,671 new cases of leprosy were reported globally in 2017.<sup>1</sup> In the same year, 26,875 new cases occurred in Brazil,<sup>2</sup> which represented 12.8% of the global burden with Brazil being responsible for 92.3% of new cases in Americas.<sup>1</sup> Leprosy diagnosis in children indicates an active transmission of the bacteria among the community and represents a public health failure.<sup>3,4</sup> Seven to eight percent of the new cases diagnosed in Brazil are represented by children.<sup>5</sup> Disease varies by municipality in Brazil with multibacillary (MB) clinical forms ranging from 23.4% to 75% of the pediatric patients;

moreover, about 3.7% of them are diagnosed with grade 2 disability.<sup>5</sup> In the beginning of 2018, the WHO stated the importance of focusing early case detection among children.<sup>6</sup> Household contacts are more prone to be infected and to develop the disease; nonetheless, more recent data reveal the importance of social contact (neighborhood and classmates).<sup>7,8</sup> Serology does not differentiate infection and disease, but it is known that the presence of serum antibodies leads to an increased risk for developing disease.<sup>9</sup> In a study performed in hyperendemic municipalities of the Brazilian Amazon region, Barreto et al<sup>10</sup> demonstrated that 48.8% of children attending school and 41.8% of leprosy household contacts were seropositive for anti-PGL-1 antibody. According to Brasil et al,<sup>11</sup> the risk of developing leprosy is 8.6-fold times higher in household contacts presenting with positive serum antibodies and 4.4-fold times in noncontacts, in comparison to those who are seronegative. Most of the literature focuses the IgM isotype against the phenolic glycolipid-1 (PGL-1), antigen specific to *Mycobacterium leprae*. For these reasons, we have proposed in the present study of a 3-year follow-up of children who were 4–15 years of age living inside or nearby a leprosy index case's home regardless of the clinical form of leprosy. Besides dermato-neurologic evaluation, serum anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA were measured.

## MATERIAL AND METHODS

## Study Design

A prospective cohort study of leprosy contacts 4–15 years of age was carried out the years 2015–2017. Dermato-neurologic evaluation and serologic measurement were performed once a year.

## Study Location

Santana de Ipanema is located in Alagoas state, in the Northeast region of Brazil. It is the main city of the Alagoas hinterland, with a population of 47,486 inhabitants.<sup>12</sup> Its economy is mostly based on agriculture and services. The areas where the index cases live have poor access to sewerage systems.

## Participants of the Study

Children who were 4–15 years of age living inside an index case's home [household contacts (HH)] or in the neighborhood [peridomiciliary (PD) contacts] were included in the study. The index cases diagnosed between 2011 and 2015 were classified as either paucibacillary (PB) or MB, regardless of the treatment period, and were selected the National Notifiable Diseases System from both urban and rural areas. Case contacts were invited to join the study. The PD contacts were considered to be those living up to five houses on either side of the index case's home. Friends and relatives who spent at least two a week in the index case's home were also included. Those participants who did not complete the follow-up study for any reason were excluded from the analysis. After informed consent, contacts were enrolled in the study and an enrollment questionnaire administered. The participants were invited to go to the health center to be examined by a trained health

Accepted for publication March 5, 2019.

From the \*Department of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil, †Faculty of Nursing and Pharmacy (ESENFAR), Universidade Federal de Alagoas, Maceio, Alagoas, Brazil, and ‡Department of Dermatology, Hospital Universitário Walter Cantídio, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

The research was financially supported by the MCTI/CNPq/MS-SCTIE, process 403461/2012-0.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Address for correspondence: Aparecida Tiemi Nagao-Dias, PhD, Department of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, CEP 60430-372 Fortaleza, Ceará, Brazil. E-mail: anagaodias@gmail.com.

Copyright © 2019 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

ISSN: 0891-3668/19/3809-e193

DOI: 10.1097/INF.0000000000002337

professional, before blood collection. In the presence of suggestive lesions, thermal, painful and tactile sensitivity were tested, according to the protocol of the Brazilian Health Ministry.<sup>13</sup> Nerve thickness was also evaluated.

### Samples

Five milliliters of venous blood were collected in a clot activator tubes containing a gel separator. After 30 minutes, the samples were centrifuged at 1500g for 10 minutes, and the serum was separated and stored at -20°C.

### Serologic Tests

Measurement of serum anti-PGL-1 antibodies was performed as described by Macedo et al.<sup>14</sup> Ninety-six well flat-bottom microplates (Costar 3590, Cambridge, MA) were coated with 5 mg/L of native PGL-1 in absolute ethyl alcohol (50L per well), kindly donated by Bei Resources/ATCC (Manassas, VA). The microplates were incubated for 2 hours at 37°C. After, they were incubated with 1% fetal bovine serum (FBS; LGC Bio, Cotia, SP, Brazil) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 2 hours at 37°C in a humid chamber. After four washes with PBS-0.05% FBS, serum samples previously diluted (1:200 for IgG and IgM and 1:50 for IgA) in PBS-0.5% FBS were added to the plates (50L per well, in duplicate). The plates were then incubated for 2 hours at 37°C. After washing, peroxidase-labeled anti-IgG (A0170; Sigma, Saint Louis, MO) anti-IgM (SAB3701404; Sigma, Saint Louis, MO) or anti-IgA (A0295; Sigma, Saint Louis, MO), previously diluted to 1:2500, 1:9000, and 1:1000, respectively, was added to the plates and incubated for 1.5 hours at 37°C. After washing, the plates were incubated for 30 minutes with the substrate solution (100L per well) which contained 0.4 mg orthophenylenediamine/mL of 0.01 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0 and 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> final concentration. The reaction was interrupted by adding 25 L 2.5N sulfuric acid. The analysis was performed at 492 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (ASYS Expert Plus; Biochrom, Cambridge, United Kingdom). An aliquot of pooled normal human serum was used as cutoff sample and tested in all assays. A negative and a positive control were included in the assays.

The results were expressed as optical density (OD) mean of the test sample (minus blank) divided by the OD mean of the normal human serum pool (minus blank). Values  $\geq 1.2$  were considered to be positive for IgG and IgM and  $\geq 1.1$  for IgA, according to Macedo et al.<sup>14</sup> The cutoff sample was obtained from 50 healthy blood seronegative donors to HIV, Chagas, hepatitis B and C, HTLV, syphilis and that did not present with leprosy at the time of sample collection.

### Statistical Analysis

The data were analyzed using nonparametric tests as the data did not follow a Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test). The Spearman test was used to correlate the antibody isotype titers in paired groups. The Mann-Whitney *U* test was used to compare the antibody isotype titers between household and PD leprosy contacts. The Friedman test was used to compare the isotype antibody titers among three paired groups. The Fisher test was used to analyze the association between the frequency of positive serum antibody isotypes with the presence of lesions, and also with leprosy diagnosis. The relative risk (RR) with a confidence interval of 95% was calculated to evaluate the risk of presenting positive serum antibody isotype and the presence of lesions, and also with leprosy. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0. The level of statistical significance was 5% ( $P < 0.05$ ).

### Ethical Aspects

The project was approved by the National Committee for Research Ethics (process 532,850; February 18, 2014). After explanation of the project, the guardians of the participants were asked to sign a consent form. The participants who were 8–15-year-olds also signed an assent form.

### RESULTS

In 2015, 155 young people who were 4–15-year-olds living in Santana do Ipanema municipality were enrolled in the project. In 2016, many of them did not return. In the follow-up study, a total of 68 participants completed annual follow-up dermatoneurologic evaluation and serologic testing. In 2017, those participants who presented lesions during the follow-up study were examined by a dermatologist. Twenty-five contacts of PB cases (PB contacts) and 43 contacts of MB cases (MB contacts) were evaluated. Thirty-two participants were HH contacts and 36 were PD contacts.

Among the PB contacts, no significant variation in respect to the IgM isotype titers was found in the follow-up study (Fig. 1A). In respect to IgG (Fig. 1B) and IgA antibodies (Fig. 1C), a significant decrease in the antibody titers was observed comparing 2015 and 2016 ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively). Among the MB contacts, the antibody titers also decreased comparing 2015 and 2016, for both IgM ( $P < 0.01$ ; Fig. 1A) and IgG isotypes ( $P < 0.001$ ; Fig. 1B). The lowest antibody titers were found in 2017 in comparison to 2015 for both IgG ( $P < 0.05$ ; Fig. 1B) and IgA ( $P < 0.001$ ; Fig. 1C), but also in comparison to 2016 in relation to IgA ( $P < 0.05$ ; Fig. 1C).

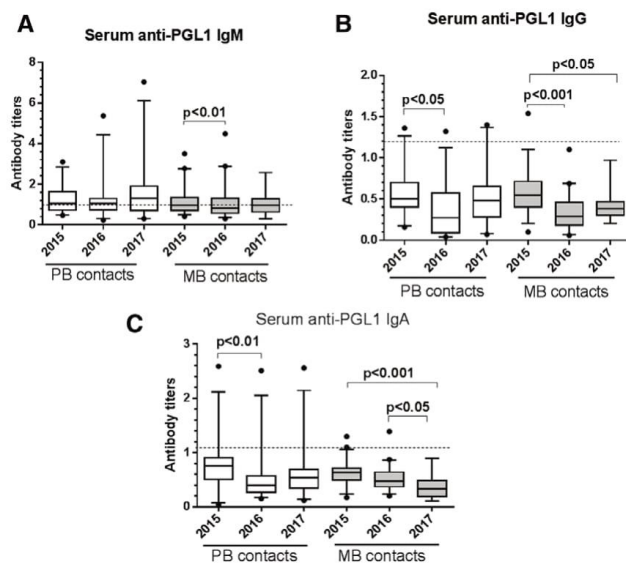
There was a positive correlation between anti-PGL-1 IgG and IgM levels among MB contacts in 2015 (Spearman correlation;  $r = 0.56$  and  $P = 0.001$ ) (Fig. 2A), and between anti-PGL-1 IgM and IgA levels among PB contacts in 2016 ( $r = 0.45$  and  $P = 0.02$ ) (Fig. 2B), and between IgG and IgA anti-PGL-1 among MB contacts in 2017 ( $r = 0.37$  and  $P = 0.02$ ) (Fig. 2C).

Higher levels of serum antibodies were found among HH contacts than among the PD contacts for all isotypes (Fig. 3). This difference was statistically significant for anti-PGL-1 IgM and IgA ( $P = 0.03$ ), and also for anti-PGL-1 IgG ( $P = 0.04$ ) in 2016, and for anti-PGL-1 IgM ( $P = 0.01$ ) in 2017.

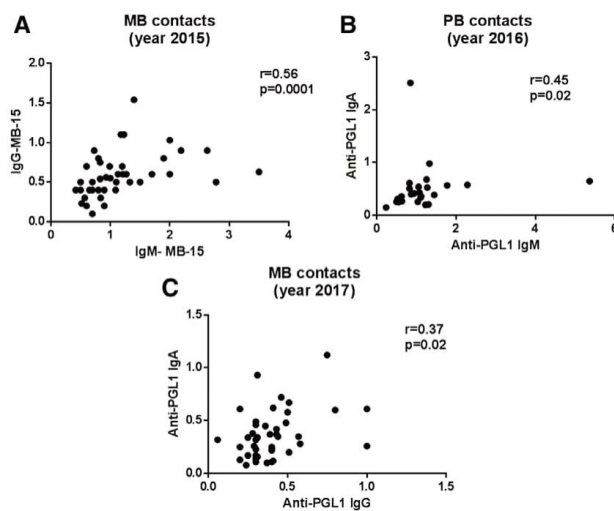
The Table 1 shows the number of participants who presented with suspected leprosy skin lesions ( $n = 23$ ) and who did not ( $n = 45$ ) during the follow-up study and the percentages of seropositivity or negativity for each isotype. The IgM isotype was positive in 26.1% to 43.5% of contacts with lesions over the years of the study period. Nonetheless, a high percentage of seropositive IgM in the absence of lesions (40.0%–46.7%) was observed. A low frequency of positive IgA was observed in the contacts with the presence of lesions (8.6%). A high frequency of seronegative IgA was found among those contacts that did not present any lesion (95.6%–100.0%). A strong association was found between IgG isotype seropositivity and the presence of lesions (Fisher's test,  $P = 0.035$ ). The RR for contacts presenting with lesions and positive anti-PGL-1 IgG was 3.25 (IC<sub>95%</sub>: 2.26–4.68).

In 2017, the contacts with suspicious lesions were evaluated by a dermatologist. Eight cases of leprosy (11.8%) were diagnosed among the 68 participants. One of them was diagnosed with lepromatous leprosy, one with borderline leprosy, six with the indeterminate leprosy. Four were HH contacts and four were PD contacts with two being MB contacts and six PB contacts. Five of the eight contacts diagnosed with leprosy (62.5%) had positive anti-PGL-1 antibodies.

One of the contacts (Table 3) was seropositive for anti-PGL-1 IgA in 2015. In 2016, he began to present positive IgG and IgA, but no lesions. In 2017, all isotypes were positive. In that year, he presented a slight hypochromic lesion with alopecia behind the neck. He was diagnosed with the indeterminate form of the disease.



**FIGURE 1.** Follow-up study of leprosy PB ( $n = 25$ ) and MB ( $n = 43$ ) contacts 4–15 years of age, Santana do Ipanema municipality, Alagoas state, Brazil (from 2015 to 2017): serum anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA levels.



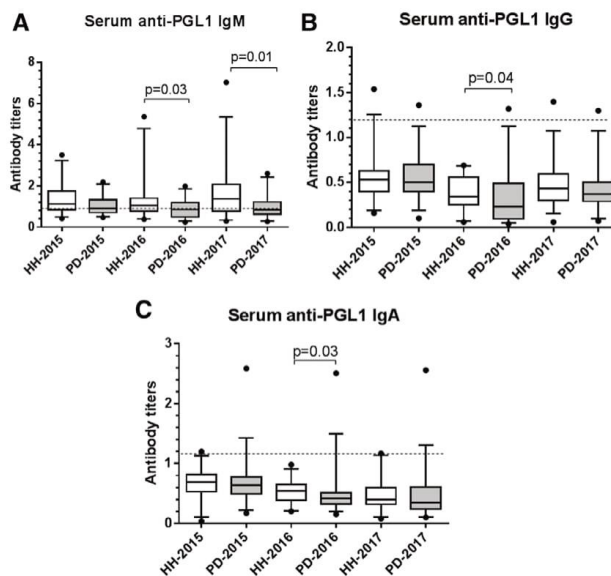
**FIGURE 2.** Follow-up study of leprosy PB ( $n = 25$ ) and MB ( $n = 43$ ) contacts 4–15 years of age, Santana do Ipanema municipality, Alagoas state, Brazil (from 2015 to 2017): correlation between serum anti-PGL-1 isotypes.

The Table 2 shows the accuracy of the anti-PGL-1 tests in the newly diagnosed leprosy cases. Anti-PGL-1 IgG was considered to the best serologic marker because of its strong association with confirmed leprosy (Fisher's test,  $P < 0.05$ ). The RR of developing leprosy and presenting with positive serum anti-PGL-1 IgG was 8.5 times (95% confidence interval: 4.0–18.0). The diagnostic sensitivity and specificity for the test were 25.0% (3.2%–65.0%) and 100.0% (92.1%–100.0%), respectively. The positive and negative predictive values were 100.0% (15.8%–100.0%) and 88.2% (76.1%–95.6%),

respectively. There was no significant association between anti-PGL-1 IgM isotype and disease (Fisher's test:  $P = 0.46$ ), nor between anti-PGL-1 IgA and disease (Fisher's test:  $P = 0.15$ ).

## DISCUSSION

Leprosy in children and in young people indicates active transmission in the community.<sup>15</sup> As we demonstrated recently in Rio Largo, another municipality of the Alagoas state, in 2016, 36%



**FIGURE 3.** Follow-up study of leprosy PB and MB contacts 4–15 years of age, Santana do Ipanema municipality, Alagoas state, Brazil (from 2015 to 2017): serum anti-PGL-1 IgM, IgG, and IgA levels in HH contacts (n = 32) and PD contacts (n = 36).

**TABLE 1.** Percentual of Seropositivity/Seronegativity for Anti-PGL-1 Among Leprosy Contacts With and Without Lesions

Anti-PGL-1 IgM										
Year	With Lesions (n = 23) Anti-PGL-1 IgM				Without Lesions (n = 45) Anti-PGL-1 IgM				Fisher's Test, P	RR (IC <sub>95</sub> )
	Positive		Negative		Positive		Negative			
	n	%	n	%	N	%	n	%		
2015	6	26.1	17	73.9	21	46.7	24	53.3	0.12	n.d.
2016	10	43.5	13	56.5	18	40.0	27	60.0	0.60	n.d.
2017	10	43.5	13	56.5	21	46.7	24	53.3	1.0	n.d.

Anti-PGL-1 IgA										
Year	With Lesions (n = 23) Anti-PGL-1 IgA				Without Lesions (n = 45) Anti-PGL-1 IgA				Fisher's Test, P	RR (IC <sub>95</sub> )
	Positive		Negative		Positive		Negative			
	n	%	n	%	N	%	n	%		
2015	2	8.6	21	91.4	2	4.4	43	95.6	0.599	n.d.
2016	2	8.6	21	91.4	0	0.0	45	100.0	0.11	n.d.
2017	2	8.6	21	91.4	3	6.6	42	93.4	1.0	n.d.

Anti-PGL-1 IgG										
Year	With Lesions (n = 23) Anti-PGL-1 IgG				Without Lesions (n = 45) Anti-PGL-1 IgG				Fisher's Test, P	RR (IC <sub>95</sub> )
	Positive		Negative		Positive		Negative			
	n	%	n	%	N	%	n	%		
2015	1	4.3	22	95.7	1	2.2	44	97.8	1.0	n.d.
2016	1	4.3	22	95.7	0	0.0	45	100.0	0.34	n.d.
2017	3	13.0	20	87.0	0	0.0	45	100.0	0.035*	3.25 (2.26–4.68)

\*P < 0.05.  
n.d. indicates not determined; IC, 95% confidence interval.

**TABLE 2.** Association of Anti-PGL-1 With the New Leprosy Cases and With Those Who Did Not Present Any Suspected Lesions During the Follow-up Study (From 2015 to 2017)

	Leprosy (n = 8)	Without Lesions (n = 45)
Anti-PGL-1 IgG		
Seropositive	2	0
Seronegative	6	45
Total	8	45
Fisher's test: $P = 0.02$ ; RR: 8.5 (IC <sub>95%</sub> : 4.0–18.0)		
Diagnostic sensitivity: 25.0% (3.2%–65.0%)		
Diagnostic specificity: 100.0% (92.1%–100.0%)		
Positive predictive value: 100.0% (15.8–100.0%)		
Negative predictive value: 88.2% (76.1%–95.6%)		
Anti-PGL-1 IgA		
Seropositive	2	3
Seronegative	6	42
Total	8	45
Fisher's test: $P = 0.15$		
IgM anti-PGL-1		
Seropositive	5	21
Seronegative	3	24
Total	8	45
Fisher's test: $P = 0.46$		

of leprosy contacts had a positive anti-PGL-1 IgM in saliva. This likely indicates presence of *M. leprae* in community and consequently active transmission.<sup>16</sup> Additionally, in 2015 the detection rate in that municipality was about 20 cases per 100,000 inhabitants. For this reason, it will be almost impossible to achieve the goal of breaking transmission during the next few years as intended by the WHO strategy.<sup>17</sup>

In reality in this setting, active case finding is rarely carried out with people who have suspicious lesions having to self report to a health center to be diagnosed. Unfortunately, untrained professionals often miss the diagnosis there. It is important to remember that the type of research we performed requires a close partnership with the municipality. In our study, eight new cases of leprosy were diagnosed among the 68 participants, that is, 11.8%. Although the participants were referred to a doctor every time suspected lesions were found, none of them got his/her diagnosis until the dermatologist invited by the project went to examine them in the last year of the study (2017). This reveals the challenge faced by these communities in controlling the disease. Hopefully research such as ours will stimulate increased effort in training and diagnosis of leprosy by municipal health authorities. Some problems of this nature have already been reported by other researchers.<sup>18</sup>

Besides the fact that leprosy has a long incubation period, it is rather difficult to diagnose early stages of the disease.<sup>19</sup> Some factors that may favor the development of the disease include crowded homes with little exposure to sunlight or natural ventilation, which

guarantees a favorable environment for subsistence of mycobacteria in the environment.

Armadillos are natural hosts of *M. leprae* and may cause zoonotic leprosy.<sup>20</sup> Nonetheless, most of the infected people do not have contact with those animals, and although there are still some doubts in the literature in respect to the mode of transmission, it is widely accepted that individuals who reside in the household and those who have close contact to MB and to PB patients are more prone to develop the disease.<sup>10,19</sup> Mohanty et al<sup>21</sup> have found genetic material of *M. leprae* in soil and water around the houses of leprosy patients which provides some evidence of the bacterial persistence in environment.

In the present study, half of the newly diagnosed participants were HH contacts, and the others were PD contacts. Interestingly, two were MB contacts; the others six participants were PB contacts. This evidence reinforces that leprosy contacts are more prone to develop the disease, independently of the clinical form of the index case and independently of living inside the same house. It is enough to have a close contact to the case index. Another point that we have observed in our study is that when children were diagnosed early they presented with the indeterminate form. The fact that two contacts were diagnosed with the MB form likely indicates delayed diagnosis. It is important to note that atopic and malnourished children are at increased risk.<sup>22,23</sup> Interestingly, PGL-1 can itself down-regulate the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by macrophages.<sup>24</sup>

Considering the importance of early diagnosis in children, the question arises is if there is any biomarker that could predict the onset of leprosy in infected people.<sup>9</sup>

Anti-PGL-1 IgM isotype has been used in searching for infection,<sup>7</sup> but not necessarily for the disease, because once positive, IgM can be found in both infection and disease, although it has been demonstrated that there is a good correlation between the IgM antibody and bacillary load.<sup>25</sup> Moreover, its positivity suggests an increased risk for developing leprosy.<sup>26</sup>

Brito e Cabral et al<sup>27</sup> demonstrated a good correlation between anti-PGL-1 IgG in cases and their contacts, and suggested its use in follow-up studies. In that study, the authors found that among those leprosy contacts who presented with negative IgG, 58% showed positivity to IgM. On the other hand, 74% of positive IgG samples were also positive for IgM.

Chujor et al<sup>28</sup> suggested IgA as a biomarker for early detection of the disease. Macedo et al<sup>14</sup> found a strong correlation between serum anti-PGL-1 IgM and IgA in MB patients, and a moderate correlation was found in PB patients. The isotype showed a better performance than IgG. For this reason, the IgA isotype was also recommended to be used in follow-up studies, besides the search for IgG and IgM antibodies.

In the present study, anti-PGL-1 IgM was present in 40%–46% among the participants without lesions and in 26%–44% among those with lesions. The percentage of positive IgA was very low in the presence of lesions. Interestingly, a strong association was found between seropositive IgG and the presence of lesions (RR of 3.25 times).

**TABLE 3.** Follow-up Serologic Profile of a Child Who Was Diagnosed With Leprosy in 2017

Sex	Age (Years Old)	Type of Contact	Operational Classification of Case Index	Skin Lesions	Diagnosis	Year	Serum Anti-PGL-1		
							IgM	IgG	IgA
Male	7	PD	PB	One hypochromic lesion	Indeterminate	2015	0.66	0.43	<b>2.59</b>
						2016	0.85	<b>1.32</b>	<b>2.51</b>
						2017	<b>1.70</b>	<b>1.30</b>	<b>2.50</b>

Bold values indicate positive values, that is, results that were equivalent or above the cut-off values.

In respect to the performance of the serologic tests in the newly diagnosed leprosy cases, anti-PGL-1 IgG was considered to be the best biomarker, with a RR was 8.5 times for the presence of positive serum anti-PGL-1 IgG and leprosy. No association was found between the IgM isotype and disease, nor between the IgA isotype and disease.

Our data supports the use of anti-PGL-1 IgG isotype in monitoring pediatric leprosy contacts, in addition to IgA and IgM. Although its positivity is low, when it is present, careful examination of the child is warranted as one may be facing a new case of leprosy. In cases without antibody, it is important to have the case evaluated by someone with expertise in diagnosing the disease.<sup>29</sup> Thus, while the diagnosis of cases is complex, we must use current serologic tools and clinical expertise to reduce the current large disease burden in Brazil.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the kindly assistance provided by the health professionals, particularly, Mrs. Ana Lúcia Carneiro Leal, Mrs. Maria do Socorro da Costa Freire, Mrs. Fabílenia Mendes, and Mrs. Gílvania Franca Vilela.

#### REFERENCES

- World Health Organization. Weekly epidemiol record. 2018. Available at: <http://www.who.int/wer>. Accessed November 6, 2018.
- Brasil. Ministério da Saúde. Sala de apoio à gestão estratégica, SAGE. Hanseníase. Indicadores de morbidade. 2018. Available at: <http://sage.saude.gov.br/#>. Accessed November 4, 2018.
- Smith WC, van Brakel W, Gillis T, et al. The missing millions: a threat to the elimination of leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9:e0003658.
- Oliveira MB, Dimiz LM. Leprosy among children under 15 years of age: literature review. *An Bras Dermatol*. 2016;91:196–203.
- Vieira MCA, Nery JS, Paixão ES, et al. Leprosy in children under 15 years of age in Brazil: a systematic review of the literature. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006788.
- World Health Organization. Leprosy: world focused on ending transmission among children. 2018. Available at: [https://www.who.int/neglected\\_diseases/news/Leprosy\\_ending\\_transmission\\_among\\_children/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/news/Leprosy_ending_transmission_among_children/en/). Accessed February 13, 2019.
- Barreto JG, Bisanzio D, Guimarães Lde S, 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.
- Narang T, Kumar B. Leprosy in children. *Indian J Paediatr Dermatol*. 2019;20:12–24.
- Smith WC, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. *Lepr Rev*. 2014;85:2–17.
- Barreto JG, Guimarães Lde S, Frade MA, et al. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(suppl 1):60–67.
- Brasil MTLRF, Oliveira LR, Rimoli NS, 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. *Rev Bras Epidemiol*. 2003;6:262–271.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Santana do Ipanema–Panorama. 2018. Available at: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/al/santana-do-ipanema/panorama>. Accessed December 28, 2018.
- BRASIL. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. In: da Silva DFB, Souza T, Silva K, eds. *Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis*. Brasília, Brazil: Ministério da Saúde; 2016:58.
- Macedo AC, Guimarães JA, Rodrigues RO, et al. Serum anti-phenolic glycolipid—IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys? *J Clin Lab Anal*. 2018;32:e22276.
- Barreto JG, Guimarães Lde S, Leão MR, et al. Anti-PGL-1 seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Lepr Rev*. 2011;82:358–370.
- Macedo AC, Cunha JE Jr, Yaochite JNU, et al. Salivary anti-PGL-1 IgM may indicate active transmission of Mycobacterium leprae among young people under 16 years of age. *Braz J Infect Dis*. 2017;21:557–561.
- World Health Organization (WHO). *Global Leprosy Strategy 2016–2020: Accelerating Towards a Leprosy-Free World*. World Health Organization; 2016: 1–64.
- Salgado CG, Barreto JG, da Silva MB, et al. What do we actually know about leprosy worldwide? *Lancet Infect Dis*. 2016;16:778.
- Chaptini C, Marshman G. Leprosy: a review on elimination, reducing the disease burden, and future research. *Lepr Rev*. 2015;86:307–315.
- da Silva MB, Portela JM, Li W, et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12:e0006532.
- 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;82:23–27.
- Smart JM, Kemp AS. Ontogeny of T-helper 1 and T-helper 2 cytokine production in childhood. *Pediatr Allergy Immunol*. 2001;12:181–187.
- Chen X, Lin H, Yang D, et al. Early life undernutrition reprograms CD4+ T-cell glycolysis and epigenetics to facilitate asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2019. Epub ahead of print.
- Manca C, Peixoto B, Malaga W, et al. Modulation of the cytokine response in human monocytes by Mycobacterium leprae phenolic glycolipid-1. *J Interferon Cytokine Res*. 2012;32:27–33.
- Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev*. 2011;82:389–401.
- Barreto JG, Bisanzio D, Frade MA, et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis*. 2015;15:527.
- Brito e Cabral P, Júnior JE, 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–e1010.
- Chujor CS, Bernheimer H, Levis WR, et al. Serum IgA1 and IgM antibodies against Mycobacterium leprae-derived phenolic glycolipid-1: a comparative study in leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1991;59:441–449.
- Barreto JG, Frade MAC, Bernardes Filho F, et al. Leprosy in children. *Curr Infect Dis Rep*. 2017;19:23.

**ANEXO 3:****OS ISOTIPOS DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I PODEM SE DIFERENCIAR CONTATOS DE HANSENÍASE E PACIENTES DE HANSENÍASE?**

Pathogens and Global Health

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/ypgh20>**Can anti-PGL-I antibody isotypes differentiate leprosy contacts and leprosy patients?**

Andressa Almeida Albuquerque, Camilla dos Santos Mateus, Raphael de Oliveira Rodrigues, Évely Sampaio Lima, Lucas Oliveira Lima, Rayane Lima da Silva, Maria Amanda Mesquita Fernandes, Alexandre Casimiro de Macedo, Clódis Maria Tavares, Paula Sacha Frota Nogueira & Aparecida Tiemi Nagao-Dias

To cite this article: Andressa Almeida Albuquerque, Camilla dos Santos Mateus, Raphael de Oliveira Rodrigues, Évely Sampaio Lima, Lucas Oliveira Lima, Rayane Lima da Silva, Maria Amanda Mesquita Fernandes, Alexandre Casimiro de Macedo, Clódis Maria Tavares, Paula Sacha Frota Nogueira & Aparecida Tiemi Nagao-Dias (2022): Can anti-PGL-I antibody isotypes differentiate leprosy contacts and leprosy patients?, Pathogens and Global Health, DOI: 10.1080/20477724.2021.2021045

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/20477724.2021.2021045>

 Published online: 02 Jan 2022.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ypgh20>

## Can anti-PGL-I antibody isotypes differentiate leprosy contacts and leprosy patients?

Andressa Almeida Albuquerque<sup>a</sup>, Camilla dos Santos Mateus<sup>a</sup>, Raphael de Oliveira Rodrigues<sup>a</sup>, Évely Sampaio Lima<sup>a</sup>, Lucas Oliveira Lima<sup>a</sup>, Rayane Lima da Silva<sup>b</sup>, Maria Amanda Mesquita Fernandes<sup>b</sup>, Alexandre Casimiro de Macedo<sup>a</sup>, Clódis Maria Tavares<sup>c</sup>, Paula Sacha Frota Nogueira<sup>b</sup> and Aparecida Tiemi Nagao-Dias<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmacy, Nursing and Odontology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>b</sup>Department of Nursing, Faculty of Pharmacy, Nursing and Odontology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>c</sup>Faculty of Nursing and Pharmacy (ESENFAR), Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brazil

### ABSTRACT

**Background:** Serological tests for antibody measurement in leprosy have a series of limitations indiscriminating contacts and patients. The present paper intends to evaluate if association of more than one antibody isotype in serum samples may be a useful tool in leprosy diagnosis.

**Methods:** This study evaluated 395 leprosy contacts and 71 leprosy index cases living in endemic municipalities in Northeastern Brazil. The participants were evaluated according to their anti-phenolic glycolipid antigen-I isotype (PGL-I) profile. Serum anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA were measured by indirect ELISA.

**Results:** A strong association was found for antibody positivity in MB leprosy index cases. The odds ratios were 6.11 (95% CI 3.08 – 12.16) for IgM, 3.31 (1.66 – 6.61) for IgG, and 16.97 (8.39 – 34.2) for IgA. For IgM associated with one or more isotypes, the OR was 21.0 (95% CI 10.11 – 43.64), and for IgG + IgA, the OR was 17.58 (6.23 – 49.54). The highest diagnostic sensitivity of 76.0% (95% CI 61.8 – 86.9) was observed for IgM, and the lowest value was 24.1% (13.0 – 38.2), which was observed for IgG + IgA isotypes. Regarding presumptive positive predictive values, the lowest value was obtained for IgM at 24.7% (95% CI 18.1 – 32.3), and the highest values were observed for IgM+ one or more isotypes and for IgG + IgA isotype at 60.0% (44.3 – 74.3) and 66.7% (41.0 – 86.7), respectively.

**Conclusions:** The present work demonstrated that by associating two or more positive antibody isotypes, the risk of facing a real case of leprosy may increase.

### KEYWORDS

Leprosy contacts; anti-PGL-I; serum IgA; serum IgG; serum IgM

### Introduction

Worldwide, 202,185 new cases of leprosy were reported by the World Health Organization (WHO) in 2019 [1]. Of these, 29,936 occurred in the Americas, and 27,864 were reported in Brazil (approximately 93.07% of the total in the Americas) [1]. The three countries with the highest number of new reported cases in that year were India, Brazil, and Indonesia, which accounted for 79.01% of new leprosy cases [1]. Although there has been a progressive decrease in the incidence of leprosy, the data do not seem to be in line with reality. For instance, there are many undiagnosed cases that need to be investigated by active searches in hyperendemic areas [2].

In 2019, Brazil had an average detection rate of 13.23 new cases for every 100,000 inhabitants, and 78.4% were diagnosed with the multibacillary form [3]. In the same year, 1545 new cases were reported in children below 15 years of age [4]. Of these cases, 50 presented with grade 2 disability (3.23%), which is

representative of late diagnosis [4]. For this reason, one of the pillars of the global strategy against leprosy has been to reduce the rate of new cases in children with this level of disability [1].

Diagnosis of leprosy in children reflects active transmission of the bacteria in the community and failures in health strategies [5]. According to the epidemiological bulletin on leprosy of the health secretariat of the state of Ceará, Brazil, the state's detection rates were 17.2 cases per 100,000 inhabitants in 2019, and there were 2.8 cases in children below 15 years of age per 100,000 inhabitants [6]. A new proposal of the WHO includes early detection of new cases, accurate diagnosis, and treatment [7].

However, there is great difficulty in diagnosing leprosy in its earliest stages due to the failure of following up leprosy contacts. People who have close contact with an index case are at risk of acquiring the disease, but there are still individuals who develop the disease without knowing an index case [8]. The

**CONTACT** Raphael de Oliveira Rodrigues  [raphaelolrodrigues@gmail.com](mailto:raphaelolrodrigues@gmail.com)  Department of Clinical and Toxicology Analysis, Faculty of Pharmacy, Nursing and Odontology, Universidade Federal do Ceará, Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Fortaleza, Ceará 60430-372, Brazil

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



monitoring of people who have contact with index cases of leprosy is considered an effective measure for the early diagnosis of new cases [9].

A question that is frequently raised is whether serological tools could be used for detecting those who are prone to developing the disease [10]. It is well documented that seropositive contacts – those who present positive anti-phenolic glycolipid 1 IgM (anti-PGL-I) titers – have 2.7 times higher risk of developing leprosy than those who are seronegative. However, it is also known that less than 45% of anti-PGL-I IgM contacts develop leprosy [11]. Thus, in the present work, we intend to evaluate if association of more than one antibody isotype in serum samples may be a useful tool in leprosy diagnosis. This approach was examined through a cross-sectional study in four municipalities of the northeastern region of Brazil.

### Material and methods

**Study design** – The present work is a cross-sectional study and included children and young people aged 4 to 15 years who were in contact with leprosy index cases. The contacts and index cases were living in municipalities with high, very high, or hyperendemic rates of leprosy. The municipalities were Rio Largo (RL, Alagoas, high endemicity), Santana do Ipanema (SI, Alagoas, very high endemicity), São Gonçalo do Amarante (SGA, Ceará, high endemicity), and Canindé (CAN, Ceará, hyperendemic leprosy rates). Home visits were scheduled for children and young people to be examined by skilled nursing professionals and trained students. In the municipalities of SGA and CAN, the project relied on the Academic League of Stigmatized Diseases, which was coordinated by the PhD nurse Paula Sacha Nogueira. In the municipalities of RL and SL, the participants were evaluated by local skilled nursing professionals at the Specialized Unit in Tuberculosis and Leprosy, Santana do Ipanema, and by nursing students and professionals under supervision of the PhD nurse Clodis Maria Tavares in Rio Largo.

**Leprosy contacts** – Contacts aged 4–15 years old ( $N = 395$ ) were evaluated in terms of the presence of lesions (aspect, number) and nerve thickness. Endogen histamine and thermal, pain, and tactile sensitivity were evaluated when necessary. A clinical sociodemographic questionnaire was administered to the participants (see supplementary material appendices 1 and 2).

Children and young people who lived inside the index case's home were classified as household contacts (HH). Those living up to five houses to the right or left of the index case's home were considered peridomiciliary contacts (PD). Friends and relatives who spent some time in the index case's house were also included in the former group. The participants were also classified according to the WHO operational classification of

leprosy index cases as paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) contacts [12]. At the health center, blood was collected (4 mL) in tubes containing anticoagulant, and after centrifugation, serum samples were aliquoted, transported to the Laboratory of Immunology, UFC, Ceará, and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**Index cases** – Leprosy patients ( $N = 71$ , aged 10 to 97 years old) were selected according to the registration of the National Notifiable Diseases System (SINAN) of each municipal health secretariat and defined as index cases. They were invited to go to a health center, where a clinical sociodemographic questionnaire (see supplementary material appendix 3) was administered, and venous blood without anticoagulant was collected (4 mL). After obtaining serum, the samples were transported to the Laboratory of Immunology, UFC, Ceará, and maintained at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

The index cases were classified in paucibacillary or multibacillary according to the WHO classification [12]. A paucibacillary clinical form was considered when a compromised anatomical region and/or nervous trunk was identified. A multibacillary clinical form was considered when two or more anatomical regions or more than one nervous trunk were affected. Information about treatment was also obtained from the medical records.

**Ethical aspects** – The project was approved by the National Committee for Research Ethics (process CAAE 11709213.9.0000.5054). After explanation of the project, the guardians of the participants were asked to sign a consent form. Participants aged 8 to 15 years old were also asked to sign a consent form themselves, as were the index cases.

**Serological tests** – Serum anti-PGL-I antibodies were measured as described by Macedo et al. [13] with slight modifications. Microplates precoated with 5 mg/L of native PGL-I (donated by BEI Resources/ATCC, Manassas, USA) were incubated with 1% fetal bovine serum (FBS, Gibco™, Brazil) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humid chamber. After washing, serum samples were diluted in PBS with 0.5% FBS (1:200 for IgG and IgM; 1:50 for IgA), added to plates (50  $\mu\text{L}$  per well in duplicate), and incubated for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After washing, the conjugates [peroxidase-labeled anti-IgG (code A0170, Sigma, USA), anti-IgM (code SA5-10293, Thermo, USA), and anti-IgA (code A0295, Sigma, USA) diluted to 1:20000, 1:2500, and 1:12000, respectively] were added to the plates and incubated for 1.5 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After washing, the plates were incubated for 30 min at room temperature with chromogen/substrate solution for ELISA (100  $\mu\text{L}$  per well), which contained tetramethylbenzidine (TMB) (Invitrogen™, USA). The reaction was interrupted by adding 25  $\mu\text{L}$  of 2.5 N sulfuric acid. The analysis was performed at 450 nm and 620 nm (reference wavelength) using an ELISA plate reader (ASYS Expert Plus, Biochrom, UK).

Four wells contained all reagents except for serum and were used as blank samples. An aliquot of pooled normal human serum (NHS) was used as a cutoff sample and tested in all assays in quadruplicate. The NHS pool comprised serum samples from 50 local blood donors, who were seronegative for HIV, Chagas, hepatitis B and C, HTLV, syphilis and did not present leprosy at the time of sample collection [13]. Titration of the conjugates were done in order that the optical density (OD) of the cutoff serum sample did not exceed 0.250. The negative control OD should be below the mentioned value, and the positive control OD should be at least five times above the mentioned value (see supplementary material appendix 4).

**Statistical analysis** – The data were analyzed using nonparametric tests as the values did not follow a Gaussian distribution (Kolmogorov-Smirnov test). The Kruskal-Wallis test was used to compare antibody levels from three or more groups. The Fisher test was used to analyze the possible association between the frequency of positive or negative serum antibody levels in leprosy index cases and contacts. The odds ratio (OR) and 95% confidence interval were calculated to evaluate the odds of presenting leprosy and 1 or  $\geq 2$  positive serum antibody isotypes. Diagnostic sensitivity and specificity and positive and negative predictive values were also calculated. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6.0, and the level of statistical significance was 5% ( $p < 0.05$ ).

## Results

The study included 395 leprosy contacts in the age group of 4 to 15 years, who were divided in those without lesions ( $N = 340$ , named healthy contacts) and those with suspected lesions ( $N = 55$ ). Among those without lesions (Table 1A), 175 were female children (median age 10 years old), and 165 were male children (median age 9 years old). The participants were classified as HH contacts ( $N = 67$ ), PD contacts ( $N = 273$ ), PB contacts ( $N = 89$ ), and MB contacts ( $N = 251$ ).

Among those with lesions (Table 1B), there were 29 female children (median age 11 years old) and 26 male children (median age 10 years old). The participants were classified as HH ( $N = 20$ ), PD ( $N = 35$ ), PB ( $N = 23$ ), and MB ( $N = 32$ ) contacts. Three of them showed nerve thickness. They presented grade 0 disability. The participants with suspected lesions or nerve thickness were referred to the health center to be examined by a physician. After the project was finished, 7 contacts with suspicion got diagnosis of leprosy (6 with the indeterminate clinical form and 1 with the borderline clinical form of leprosy).

Thirty female index cases (median age 46 years old) and 41 male index cases (median age 50 years old) were included in the study (Table 1C). The index cases were classified as having the PB clinical form ( $N = 21$ ) and MB clinical form ( $N = 50$ ). Eighteen index cases (25.4%) were under treatment, 12 index cases (16.9%) were recruited one year after treatment, 6 index cases (8.5%) were recruited two years after treatment, and 25 index cases (35.2%) were recruited 3 or more years after treatment. Information regarding treatment from ten index cases was missing in the medical records (14.1%). No statistical differences were found with respect to antibody levels considering the year after treatment (Kruskal-Wallis test,  $p = 0.61$  for IgM,  $p = 0.075$  for IgG and  $p = 0.61$  for IgA, data not shown).

### Serum anti-PGL-I titers

Figure 1 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB contacts without lesions (MB healthy contacts;  $N = 251$ ), MB contacts with suspected lesions ( $N = 32$ ), and MB leprosy index cases ( $N = 50$ ). Anti-PGL-I IgM levels were higher in MB leprosy index cases than in MB healthy contacts (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.0001$ ) and MB contacts with lesions (K-W test,  $p < 0.01$ ). Anti-PGL-I IgG levels were higher in MB leprosy index cases than in healthy contacts (K-W test,  $p < 0.001$ ). Anti-PGL-I IgA levels were higher in MB leprosy index cases than contacts with or without lesions (K-W test,  $p < 0.0001$ ).

Figure 2 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB healthy contacts ( $N = 89$ ), PB contacts with suspected lesions ( $N = 23$ ), and PB leprosy index cases ( $N = 21$ ). The only isotype that presented any statistical difference was IgA. Anti-PGL-I IgA levels were higher in PB leprosy index cases than contacts without lesions (K-W test,  $p < 0.01$ ).

Figure 3 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB contacts who were household contacts (HH contacts;  $N = 6$ ), MB peridomestic contacts (PD contacts;  $N = 26$ ), and MB leprosy index cases ( $N = 50$ ). Anti-PGL-I IgM levels were higher in MB leprosy index cases than in HH and PD multibacillary contacts (K-W test,  $p < 0.01$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Anti-PGL-I IgG levels were higher in MB leprosy index cases than in HH and PD multibacillary contacts (K-W test,  $p < 0.0001$  and  $p < 0.01$ , respectively). Anti-PGL-I IgA levels were higher in MB leprosy index cases than HH and PD multibacillary contacts (K-W test,  $p < 0.0001$ ).

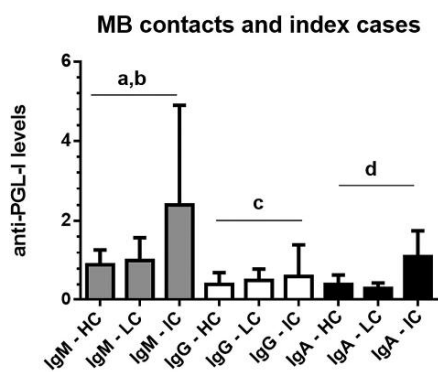
**Table 1.** Age range, gender, and clinical forms of leprosy index cases, household (HH) contacts and peridomiciliary (PD) contacts without lesions (healthy contacts), and those with lesions.

<b>(A) Contacts without lesions (healthy contacts) (N = 340)</b>					
Gender	Age median (range)	Type of contact			
		HH (N = 67)		PD (N = 273)	
		PB (N = 14)	MB (N = 53)	PB (N = 75)	MB (N = 198)
Female (N = 175)	10 (4–15 years old)	7	27	42	99
Male (N = 165)	9 (4–15 years old)	7	26	33	99
<b>(B) Contacts with lesions (N = 55)</b>					
Gender	Age median (range)	Type of contact			
		HH (N = 20)		PD (N = 35)	
		PB (N = 14)	MB (N = 6)	PB (N = 9)	MB (N = 26)
Female (N = 29)	11 (4–14 years old)	5	2	5	17
Male (N = 26)	10 (5–15 years old)	9	4	4	9
<b>(c) Index cases (N = 71)</b>					
Gender	Age median (range)	Clinical form (n = 71)			
		PB (N = 21)	MB (N = 50)		
Female (N = 30)	46 (10–81 years old)	12	18		
Male (N = 41)	50 (15–97 years old)	9	32		

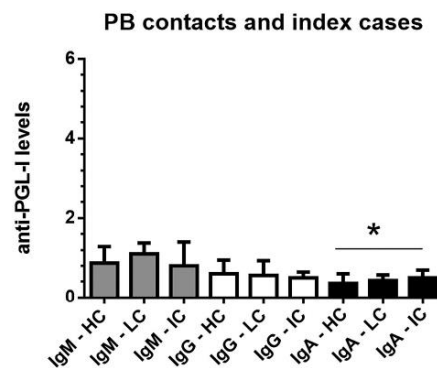
Obs. HH (household contacts); PD (peridomiciliary contacts); PB (paucibacillary); MB (multibacillary).

Figure 4 presents the interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB household contacts (N = 14), PB peridomiciliary contacts (N = 14), and PB leprosy

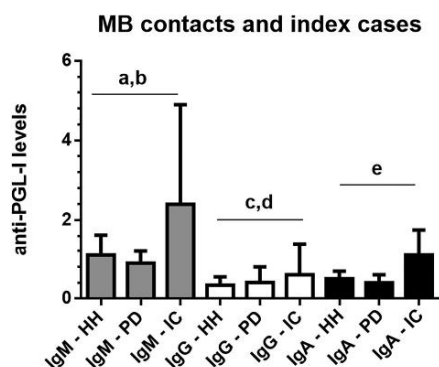
index cases (N = 21). The only isotype that presented any statistical difference was IgA. Anti-PGL-I IgA levels were higher in PB leprosy index cases than PB peridomiciliary contacts (K-W test,  $p < 0.05$ ).



**Figure 1.** Interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB (multibacillary) contacts without lesions/MB healthy contacts (HC; N = 251), MB contacts with suspected lesions (LC; N = 32), and MB leprosy index cases (IC; N = 50). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. <sup>a</sup> $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgM levels in MB index cases were higher than in MB healthy contacts; <sup>b</sup> $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgM levels in MB index cases were higher than in MB contacts with lesions; <sup>c</sup> $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgG levels in MB index cases were higher than in MB healthy contacts; <sup>d</sup> $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgA levels in MB index cases were higher than in MB healthy contacts and contacts with lesions.



**Figure 2.** Interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB (paucibacillary) contacts without lesions/PB healthy contacts (HC; N = 89), PB contacts with suspected lesions (LC; N = 23), and PB leprosy index cases (IC; N = 21). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. \* $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgA levels in PB index cases were higher than in PB healthy contacts.

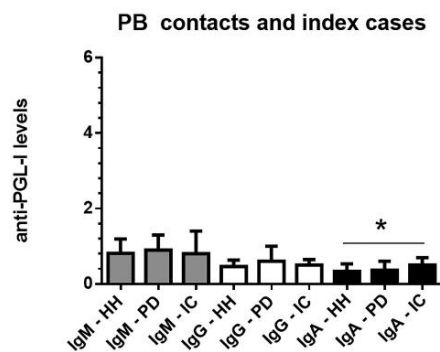


**Figure 3.** Interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from MB (multibacillary) contacts who were household (HH, N = 6), or MB peridomicilliary contacts (PD, N = 26), and MB leprosy index cases (N = 50). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. <sup>a</sup> $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgM levels in MB index cases were higher than in PD contacts; <sup>b</sup> $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgM levels in MB index cases were higher than in HH contacts; <sup>c</sup> $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgG levels in MB index cases were higher than in HH contacts; <sup>d</sup> $p < 0.01$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgG levels in MB index cases were higher than in PD contacts; <sup>e</sup> $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgA levels in MB index cases were higher than in HH and PD contacts.

#### Frequency of positive anti-PGL-I antibodies

The frequency of positive antibody isotypes was evaluated in leprosy index cases with the PB clinical form (Table 2) and the MB clinical form (Table 3) in association with healthy contacts. No association was found between the positivity of anti-PGL-I and index cases with the PB clinical form, irrespective of the isotype ( $p = 1.0$  for IgM and IgG and  $p = 0.055$  for IgA, Fisher test). Nonetheless, a strong association was found for all antibody isotypes in MB leprosy index cases ( $p < 0.0001$  for IgM and IgA and  $p = 0.0014$  for IgG, Fisher test).

Regarding the IgM isotype, the OR was 6.11 (95% CI 3.08–12.16). For the IgG isotype, the OR was 3.31 (95% CI 1.66–6.61). For the IgA isotype, the OR was 16.97 (95% CI 8.39–34.2). When positive IgM was



**Figure 4.** Interquartile ranges and medians of anti-PGL-I IgM, IgG, and IgA levels in serum samples from PB (paucibacillary) household contacts (HH, N = 14), PB peridomicilliary contacts (PD, N = 14), and PB leprosy index cases (N = 21). The cutoff values were 1.1 for IgA and 1.2 for IgG and IgM isotypes. <sup>\*</sup> $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test, anti-PGL-I IgA levels in PB index cases were higher than in PD contacts.

considered together with one or more isotypes ( $p < 0.0001$ , Fisher test), the OR was 21.0 (95% CI 10.11–43.64), and when positive IgG and IgA status was analyzed ( $p < 0.0001$ , Fisher test), the OR was 17.58 (95% CI 6.23–49.54).

The highest diagnostic sensitivity was observed for the IgM isotype at 76.0% (95% CI 61.8–86.9), and the lowest value was observed for IgG + IgA isotypes at 24.1% (95% CI 13.0–38.2). With respect to diagnostic specificity, the highest value was obtained for IgG + IgA isotypes at 98.2% (95% CI 96.2–99.4), and the lowest value was for the isolated IgM isotype at 65.9% (95% CI 60.6–70.9). Regarding presumptive positive predictive values, the lowest value was obtained for IgM at 24.7% (95% CI 18.1–32.3), and the highest values were observed for IgM + one or more isotypes and for IgG + IgA isotype at 60.0% (95% CI 44.3–74.3) and 66.7% (95% CI 41.0–86.7), respectively. Negative predictive values were high for all the isolated or associated isotypes. For instance, for the IgM isotype, the negative predictive value was 94.9 (95% CI 91.3–97.4), and that for IgM associated with one or more isotypes was 93.3% (95% CI 90.2–95.7).

**Table 2.** Frequency of positive/negative anti-PGL-I levels in paucibacillary leprosy index cases and healthy contacts.

	Serum anti-PGL1									
	IgM		IgG		IgA		IgM + one or more isotypes		IgG + IgA	
	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 21)	Healthy contacts (n = 340)
<b>Positive</b>	7	116	2	39	4	22	3	18	1	6
<b>Negative</b>	14	224	19	301	17	318	18	322	20	334
<b>Fisher test</b>	<b>p = 1.0</b>		<b>p = 1.0</b>		<b>p = 0.055</b>		<b>p = 0.11</b>		<b>p = 0.35</b>	

**Table 3.** Frequency of positive/negative anti-PGL-I levels in multibacillary leprosy patients and healthy contacts. Parameters of OR, diagnostic sensitivity and specificity, and negative and positive predictive values (and 95% interval confidence) for isolated anti-PGL-I IgA, IgM, IgG, IgM + one or more isotypes, and IgG + IgA antibody levels.

	Serum anti-PGL1									
	IgM		IgG		IgA		IgM + one or more isotypes		IgG + IgA	
	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)	Index cases (n = 50)	Healthy contacts (n = 340)
<b>Positive</b>	38	116	15	39	27	22	27	18	12	6
<b>Negative</b>	12	224	35	301	23	318	23	322	38	334
<b>Fisher test</b>	<b>p &lt; 0.0001</b>		<b>p = 0.0014</b>		<b>p &lt; 0.0001</b>		<b>p &lt; 0.0001</b>		<b>p &lt; 0.0001</b>	
<b>Odds ratio</b>	6.11		3.31		16.97		21.0		17.58	
<b>(95% CI)</b>	(3.08–12.16)		(1.66–6.61)		(8.39–34.2)		(10.11–43.64)		(6.23–49.54)	
<b>Diagnostic sensitivity</b>	76.0		30.0		54.0		54.0		24.0	
<b>(95% CI)</b>	(61.8–86.9)		(17.8–44.6)		(39.3–68.2)		(39.3–68.2)		(13.0–38.2)	
<b>Diagnostic specificity</b>	65.9		88.5		93.5		94.7		98.2	
<b>(95% CI)</b>	(60.6–70.9)		(84.7–91.7)		(90.4–95.9)		(91.8–96.8)		(96.2–99.4)	
<b>Positive predictive value</b>	24.7		27.8		55.1		60.0		66.7	
<b>(95% CI)</b>	(18.1–32.3)		(16.5–41.6)		(40.2–69.3)		(44.3–74.3)		(41.0–86.7)	
<b>Negative predictive value</b>	94.9		89.6		93.3		93.3		89.8	
<b>(95% CI)</b>	(91.3–97.4)		(85.8–92.6)		(90.0–95.7)		(90.2–95.7)		(86.3–92.7)	

CI = confidence interval.

## Discussion

Although leprosy has been eliminated as a public health problem in several countries [14], Brazil is one of the countries that still suffers from a high incidence, late diagnosis, and grade 2 physical disability at diagnosis [15]. Diagnosis in primary care is essentially clinical based on the search for injuries with altered sensitivity and/or thickened nerves [12]. Delays in diagnosis are due to a lack of the patient's knowledge, as well as a lack of knowledge and skill of health professionals [16]. In addition, a lack of government attention may directly affect the quality of service provided to the population [7]. Another worrying factor is leprosy in children, which represent recent infections and high transmission rates [17]. Furthermore, children with leprosy indicate that they were possibly contacts of undiagnosed and therefore untreated leprosy patients [18].

Diagnostic tests have been developed and established for a multitude of infectious diseases [19], even for those just recently described [20]. Regarding leprosy diagnosis, as it is a disease that has practically no laboratory tests as support tools, there is a risk of the diagnosis being delayed by up to 10 years in Brazil [16], as well as other countries [21]. The only laboratory test available is intradermal smear microscopy, which can have a negative result in cases of paucibacillary clinical forms of leprosy [12]. Therefore, the search for biomarkers that consider the immune response to mycobacteria is extremely relevant [22].

Regarding detection of antibodies against PGL-I antigen, which is specific to the mycobacterium [23], Araújo et al. [24] found in a longitudinal study with 10 years of follow-up that those who were seropositive for anti-PGL-

-I had a 5.7-fold increased risk of developing leprosy. The authors reported disease confirmation in 2% of the participants. According to Penna et al. (2016), contacts with positive anti-PGL-I have a 3-fold higher risk of developing leprosy than those with negative anti-PGL-I. In their systematic review and meta-analysis, the authors found an overall OR of 3.05 with diagnostic sensitivities ranging of 1.96 to 39.29% and diagnostic specificities of 83.52 to 98.03% [11].

Leturiondo et al. (2021) highlight a fundamental point in that although serological tests have a series of limitations, they can be important to assist in clinical routine (for example, in differentiating leprosy from other dermatological conditions). Assessing endemic controls and patients and considering the paucibacillary and multibacillary clinical forms, the authors found diagnostic sensitivities of 32% and 81%, diagnostic specificities of 81.7% and 99%, positive predictive values of 14.9% and 43.3%, and negative predictive values of 92.9% and 94.6%, respectively [25].

In a study carried out by our group, a strong correlation was demonstrated between the anti-PGL-I IgM and IgA levels ( $r = 0.74$ ;  $p < 0.0001$ ), and there was a moderate association between the tests (Kappa coefficient of 0.48) [13]. In the multibacillary leprosy clinical form, diagnostic sensitivities for IgM, IgG, and IgA were 81.3%, 21.9%, and 53.1%, respectively. In the paucibacillary leprosy clinical form, they were 59.1%, 22.7%, and 40.9%, respectively. Diagnostic specificities were 88.2% for IgM and 100% for IgG and IgA. Therefore, at that time, we suggested the inclusion of the IgA isotype in the follow-up of contacts, in addition to the IgG and IgM isotypes [13].

During the same period, we carried out a prospective follow-up study of 69 children and young people between 4 and 15 years of age for 3 years [26]. One striking observation was that the IgG isotype showed a strong association with leprosy (relative risk of 8.5 times). One child who was a peridomiciliary contact presented increased levels of the IgA isotype three years before the appearance of a hypochromic lesion on the back of his neck. In the second year, he showed increased levels of IgG and IgA. Only in the third year of follow-up did he show increased levels of IgM, besides IgG and IgA [26]. This clearly demonstrates the importance of investigating the three antibody isotypes.

In the present work, we carried out a cross-sectional study with samples of index cases of MB and PB clinical forms and healthy contacts (children and young people without suggestive lesions or nerve thickening who lived with or next to index cases). Contacts with suspected lesions and/or nerve thickening were not included in the control group. No significant associations were found for PB leprosy. Instead, based on the data for MB leprosy, the ORs for IgM and IgG were 6.11 and 3.31, respectively. The highest OR values were found for IgA (OR 16.97), for IgM, when it was associated with one or more isotypes (OR 21.0), and for IgG + IgA isotypes (OR 17.58). This means that compared to healthy contacts, MB leprosy index cases show 16.97, 21.0, or 17.58 times the odds of presenting positive isolated IgA isotype, IgM associated with one and more isotypes, or IgG + IgA isotypes, respectively. This represents 2.77-, 3.42- or 2.87- times higher possibilities that leprosy patients will present one of the former biomarkers, respectively, than positive isolated IgM compared to healthy contacts.

A question that constantly arises is why IgM is not only used since it is known that PGL-I is a T-independent antigen [23]. The reason for seeking an association with other biomarkers is that although IgM alone has a higher diagnostic sensitivity than the other isotypes (considering the multi-bacillary forms of the disease), its diagnostic specificity is not as good. Therefore, it can impair the ability to confirm leprosy since its hypothetical positive predictive value is only 24.7%. Meanwhile, when it is associated with another isotype, there is a significant improvement in its positive predictive value, which rises to 55.1%.

Data from another study [27] corroborate our results, demonstrating that IgA is a biomarker that should be used in the follow-up of contacts and to help in the diagnosis of leprosy. That study found that IgA anti-NDO-HSA (natural octyl disaccharide bound to human serum albumin) presented diagnostic sensitivities of 100% and 95% for the multibacillary and paucibacillary forms of leprosy, as well as diagnostic specificities of 95% and 85%, respectively.

Another question that arises is why molecular tests are not used instead of serological tests. In our recent experience, virtually no blood samples from contacts were positive for *M. leprae* DNA, and only one patient's blood sample was positive (unpublished data). Contacts cannot be biopsied for obvious reasons, and nasopharyngeal molecular testing has no association with disease. Therefore, we believe that among the best biomarkers with all their limitations are antibodies, considering not only the IgM isotype but also the main isotypes present in the systemic circulation and associating them with each other and perhaps other molecules of the immune system, such as chemokines. The important idea is that if we associate the isotypes, the probability of disease can increase. In conclusion, when faced with two or more positive antibody isotypes, we may already be closer to a real case of leprosy. This would certainly help in the diagnosis of leprosy.

### Acknowledgments

We would like to thank Prof. Paulo César de Almeida, Health Sciences Center, Universidade Estadual do Ceará, Brazil, for reviewing the statistical analysis of the present manuscript.

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

### Funding

This work was financially supported by FUNCAP/PPSUS/SESA, Grant number 3966535/2017, and by MCTI/CNPq/MS-SCTIE, Grant number 403461/2012-0.

### References

- [1] World Health Organization. Global leprosy update, 2019: time to step-up prevention initiatives. *Weekly Epidemiological Rec.* 2020;95(36):417–440.
- [2] Salgado CG, Barreto JG, Da Silva MB, et al. Are leprosy case numbers reliable?. *Lancet Infect Dis.* 2018 Feb;18(2):135–137. PMID: 29412953. DOI:10.1016/S1473-3099(18)30012-4.
- [3] BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Epidemiológico: Hanseníase.* Brasília (DF), n. Especial; 2020 [cited 2020 Apr 16]. Available from: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/boletim-epidemiologico-de-hanseníase-2020>
- [4] World Health Organization. New cases of leprosy in children below 15 years of age. [cited 2021 May 12]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/leprosy-hansens-disease>
- [5] Barreto JG, Bisanzio D, Frade MAC, et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis.* 2015;15:527.

- [6] CEARÁ, Governo do Estado. Secretaria de Saúde. Boletim Epidemiológico: Hanseníase. Fortaleza (CE); 2021 [cited 2021 Jan 19]. Available from: [https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/boletim\\_epidemiologico\\_hanseniase\\_20211901\\_v2.pdf](https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/boletim_epidemiologico_hanseniase_20211901_v2.pdf)
- [7] World Health Organization. Towards zero leprosy. Global Leprosy (Hansen's Disease) Strategy 2021–2030; 2021 [Accessed 26 May 2021]. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340774>
- [8] Bratschi MW, Steinmann P, Wickenden A, et al. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Lepr Rev.* 2015;86(2):142–155.
- [9] Salgado CG, Barreto JG, Silva MB, et al. Are leprosy case numbers reliable?. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(2):135–137.
- [10] Smith WC, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. *Lepr Rev.* 2014;85(1):2–17.
- [11] Penna MLF, Penna GO, Iglesias PC, et al. Anti-PGL-I positivity as a risk marker for development of leprosy among contacts of leprosy cases: systematic review and meta-analysis. *PLOS Negl Trop Dis.* 2016;10(5):e0004703.
- [12] BRASIL. Ministério da Saúde. Guia prático sobre hanseníase. Brasília-DF; 2017 [Accessed 31 May 2021]. Available from: <https://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/22/Guia-Pratico-de-Hanseniase-WEB.pdf>
- [13] Macedo AC, Guimarães JA, Rodrigues RO, et al. Serum anti-phenolic glycolipid—IgA correlates to IgM isotype in leprosy patients: a possible candidate for seroepidemiological surveys?. *J Clin Lab Anal.* 2017;32(3):e22276.
- [14] World Health Organization. Task Force on definitions, criteria and indicators for interruption of transmission and elimination of leprosy. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. [cited 2021 Oct 26] Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/342172>
- [15] Salgado CG, Barreto JG, Da Silva MB, et al. What do we actually know about leprosy worldwide?. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(7):778.
- [16] Henry M, GalAn N, Teasdale K, et al. Factors contributing to the delay in diagnosis and continued transmission of leprosy in Brazil—an explorative, quantitative, questionnaire based study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(3):e0004542.
- [17] Barreto JG, Frade MAC, Bernardes Filho F, et al. Leprosy in children. *Curr Infect Dis Rep.* 2017;19(6):23.
- [18] Lana FC, Fabri Ada C, Lopes FN, et al. Deformities due to leprosy in children under fifteen years old as an indicator of quality of the leprosy control programme in Brazilian municipalities. *J Trop Med.* 2013;2013:812793.
- [19] Delforge ML. De l'utilité ou non de la sérologie infectieuse: morceaux choisis [On the usefulness of serology testing in infectious diseases: selected topics]. *Rev Med Brux.* 2011;32(4):285–288.
- [20] West R. Serology and other adaptive immune response testing for COVID-19. The Johns Hopkins University; 2021:1–4. [cited 2021 Oct 26] Available from: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-fact-sheets/200228-Serology-testing-COVID.pdf>
- [21] Yaghoobi R, Feily A, Ranjbari N, et al. Lepromatous leprosy: a commonly misdiagnosed disease. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:2348–2349.
- [22] van Hooij A, Geluk A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Immunol Rev.* 2021;301(1):175–192.
- [23] Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev.* 2011;82(4):344–357.
- [24] Araujo S, Rezende MMF, Sousa DCR, 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. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(6):739–745.
- [25] Leturiondo AL, Noronha AB, Do Nascimento MOO, et al. Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference center in Brazil. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):22.
- [26] Nagao-Dias AT, Macedo AC, Rodrigues RO, et al. Serum anti-PGL-I IgG, IgM, and IgA in a 3-year follow-up study of 4-15-year-old leprosy contacts. *Pediatr Infect Dis J.* 2019;38(9):e193–198.
- [27] Silva KKPE, de Oliveira EE, Elias CMM, et al. Serum IgA antibodies specific to *M. leprae* antigens as biomarkers for leprosy detection and household contact tracking. *Front Med (Lausanne).* 2021;8:698495.