

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

FACULDADE DE MEDICINA

SÉRGIO ARAÚJO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA HANSENÍASE:

**Sorologia anti PGL-I e PCR em swab nasal de pacientes com hanseníase e contatos
domiciliares.**

UBERLÂNDIA

2012

SÉRGIO ARAÚJO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA HANSENÍASE:
Sorologia anti PGL-I e PCR em swab nasal de pacientes com hanseníase e contatos
domiciliares.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart

UBERLÂNDIA

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A663e Araújo, Sérgio, 1983-
2012 Epidemiologia molecular da hanseníase : sorologia anti PGL-I
 e PCR em swab nasal de pacientes com hanseníase e contatos do-
 miciliares / Sérgio Araújo. -- 2012.
 44 f. : il.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas - Teses. 2. Hanseníase - Epidemiologia -
Teses. I. Goulart, Isabela Maria Bernardes. II. Universidade Fede-
ral de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61

SÉRGIO ARAÚJO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA HANSENÍASE:

Sorologia anti PGL-I e PCR em swab nasal de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde

Uberlândia, 10 de janeiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Isabela Maria Bernardes Goulart (Orientadora)

Examinadores: Prof. Dr. Davi Nascimento Silva Teixeira

Prof^ª. Dr^ª. Vivian Alonso Goulart

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGCS para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

RESUMO

Hanseníase é uma das mais antigas e instigantes doenças que acometem o ser humano. Ferramentas moleculares e imunológicas são avaliadas em diversos estudos epidemiológicos, porém com resultados controversos devido à alta complexidade da doença e metodologias utilizadas. Este estudo descreve o uso da sorologia anti PGL-I e da detecção de DNA em swab nasal para caracterizar a epidemiologia molecular do *Mycobacterium leprae* em pacientes e contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. Em pacientes com hanseníase a positividade nos testes ELISA anti PGL-I e PCR para a detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal são inversamente associadas ao teste de Mitsuda e são diretamente associadas com o índice baciloscópico e as formas clínicas no espectro da doença, aumentando em direção às formas bacilíferas. As porcentagens gerais de positividade em pacientes foram 63,3% para o ELISA anti PGL-I e 34,2% para a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal. Nos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase as porcentagens gerais para o ELISA anti PGL-I e para a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal foram 13,3% e 4,7% respectivamente. Os contatos com resultados positivos nestas metodologias representam portadores sadios ou com infecção subclínica e podem participar na transmissão e manutenção do *M. leprae* na comunidade, mesmo que os mesmos não venham a adoecer. É imperativo para o controle da hanseníase o monitoramento de contatos domiciliares em regiões endêmicas para detecção precoce de novos casos e a quimioprofilaxia deve ser utilizada como prevenção para o desenvolvimento da doença e interrupção da transmissão.

Palavras-chave: Hanseníase. Contatos domiciliares. PCR. ELISA.

ABSTRACT

Leprosy is one of the oldest and most instigating diseases to affect humans. Molecular and immunological tools are evaluated in epidemiological studies; however, the results present controversies mainly due to disease complexity and methodologies. This study describes the application of anti PGL-I serology and nasal swab DNA detection to characterize *Mycobacterium leprae* molecular epidemiology in patients and household contacts of leprosy patients. Among leprosy patients the positivity to the anti PGL-I ELISA and the PCR for the detection of *M. leprae* DNA in nasal swabs are inversely associated to the lepromin test and arte directly associated to the bacillary index and the clinical forms in the disease spectrum, increasing towards baciliferous forms. The overall positivity percentages were 63.3% for the anti PGL-I ELISA and 34.2% for the PCR for the detection of *M. leprae* DNA in nasal swabs. Among household contacts of leprosy patients the overall percentages for the anti PGL-I ELISA and for the PCR for the detection of *M. leprae* DNA in nasal swabs were 13.3% e 4.7% respectively. Among leprosy patients, assays positivity is associated with the clinical presentation of the disease, increasing towards bacilliferous subtypes. Positive results in contacts represent healthy carriers and subclinical infection and these individuals can participate in transmission and spread of *M. leprae* in the community, even though they may not develop the disease. In endemic regions, contact monitoring is imperative in leprosy control for early case detection and chemoprophylaxis must be applied as prevention to disease development and disruption of transmission.

Keywords: Leprosy. Household contacts. PCR. ELISA

ÍNDICE DE TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Distribuição de frequências observadas nas formas clínicas, sexo e idade média de pacientes com hanseníase.....	25
Tabela 2: Distribuição de frequências observadas nas formas clínicas do caso índice, sexo e idade média de contatos de pacientes com hanseníase.....	31
Tabela 3: Porcentagens de positividade para o ELISA anti PGL-I e a PCR para detecção do DNA de <i>M. leprae</i> em swab nasal de contatos de acordo com a forma clínica dos casos índices.....	33
Tabela 4: Resultados para a sorologia ELISA anti PGL-I contra os resultados da PCR para a detecção do DNA de <i>M. leprae</i> em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase.....	33
Gráfico 1: Porcentagens de positividade ao IB de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.....	26
Gráfico 2: Porcentagens de positividade ao teste de Mitsuda de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.....	27
Gráfico 3: Linhas de tendência das porcentagens de positividade ao IB e teste de Mitsuda de pacientes com hanseníase de acordo com classificação clínica.....	27
Gráfico 4: Porcentagens de positividade ao ELISA anti PGL-I de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.....	28
Gráfico 5: Porcentagens de positividade à PCR para detecção do DNA de <i>M. leprae</i> em swab nasal de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.....	29
Gráfico 6: Linhas de tendência para as porcentagens de positividade aos testes ELISA anti PGL-I e PCR para detecção do DNA de <i>M. leprae</i> em swab nasal de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.....	30

Gráfico 7: Linhas de tendência das porcentagens de positividade aos testes IB, Mitsuda, ELISA anti PGL-I e PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.....30

Gráfico 8: Porcentagens de positividade ao ELISA anti PGL-I em contatos de pacientes com hanseníase de acordo com a forma clínica do caso índice.....32

Gráfico 9: Porcentagens de positividade à PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de contatos de pacientes com hanseníase de acordo com a forma clínica do caso índice.
.....32

Figura 1: Visualização da detecção do DNA de *M. leprae* por eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo sob luz ultravioleta.....29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BB	borderline-borderline
BL	borderline-lepromatoso
BT	borderline-tuberculóide
°C	graus Celsius
cm	centímetro
CREDESH	Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hansenologia
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENH	eritema nodoso hansênico
g	grama
G	força gravitacional
HC	Hospital de Clínicas
HCl	ácido clorídrico
I	hanseníase indeterminada
IB	índice baciloscópico
IE	índice ELISA
IgM	imunoglobulina M
ILSL	Instituto Lauro de Souza Lima
LL	lepromatoso polar
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MB	multibacilar
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
ng	nanograma
NRAMP1	proteína um de macrófago associada a resistência natural

n°	número
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de base
PB	paucibacilar
PBS	tampão fosfato salino
PCR	reação em cadeia da polimerase
PGL-1	glicolípídeo fenólico-1
pM	picomol
PQT	poliquimioterapia
RNA	ácido ribonucléico
RR	reação reversa
s	segundo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TT	tuberculóide polar
U	unidade
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
UV	ultravioleta
µg	micrograma
µl	microlitro
µM	micromolar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
História e etiologia	10
Classificação clínica da hanseníase	11
Situação atual da hanseníase	14
Epidemiologia molecular da Hanseníase	14
JUSTIFICATIVA	17
HIPÓTESE	18
OBJETIVO	19
Objetivos específicos	19
CASUÍSTICA E MÉTODOS	20
CASUÍSTICA	20
Seleção dos pacientes	20
Seleção dos contatos domiciliares	20
Aspectos éticos	20
MÉTODOS	20
Critérios para seleção dos pacientes	20
Teste de Mitsuda	21
Índice baciloscópico (IB)	21
Critérios para seleção dos contatos	21
PCR em Swab Nasal	22
Sorologia ELISA anti PGL-I	23
Análises estatísticas	24
RESULTADOS	25
Pacientes com hanseníase	25
Contatos de pacientes com hanseníase	31
DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO

História e etiologia

A hanseníase é uma das mais antigas e instigantes doenças que acometem o ser humano. Indícios da hanseníase afetando humanos estão ligados aos primeiros registros de população humana moderna em escrituras bíblicas e védicas. A mais antiga evidência relatada em esqueletos humanos é datada de 2000 anos antes de Cristo na Índia (ROBBINS *et al.*, 2009) e evidências moleculares sugerem que devido a pouca variância genética encontrada entre cepas de diferentes lugares ao redor do mundo, a hanseníase no homem teria sido originada a partir de um único clone, e que a associação geográfica com as cepas identificadas reflete os padrões de migração do homem moderno a partir do nordeste da África (MONOT *et al.*, 2005, 2009).

O agente etiológico da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*, foi identificado em 1873, em Bergen na Noruega, pelo pesquisador Gerhard Henrik Armauer Hansen (1841-1912) e foi considerado o primeiro microorganismo patógeno a ser associado com uma doença em humanos. Para provar com sua descoberta a origem infecciosa da hanseníase, Hansen utilizou como base os trabalhos de Daniel Danielsen Cornélio (1815-1894), que fez uma extensa descrição da hanseníase, mas que acreditava na origem hereditária da doença (VOGELSANG, 1978).

Mycobacterium leprae é um microorganismo do Reino Monera, Filo e Classe Actinobacteria, Ordem Actinomicetales, Família Mycobacteriaceae composta pelo único gênero *Mycobacterium*. O *M. leprae* é visualizado em microscopia como um bacilo em forma de bastonete, reto ou levemente encurvado com extremidades arredondadas, apresentando aproximadamente 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro. Possui divisão binária lenta, é Gram-positivo e um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Na técnica de coloração para microscopia de Ziehl-Neelsen, desenvolvida em 1882 por Franz Ziehl (1857-1926) e Friedrich Neelsen (1854-1894), a fucsina confere ao bacilo uma coloração avermelhada. Esta característica é devido ao elevado teor de lípidos estruturais na parede celular, que provoca uma grande hidrofobicidade, dificultando a ação dos mordentes e diferenciadores de corantes aquosos (SHEPARD; MCRAE, 1968).

M. leprae parece ter eliminado genes normalmente necessários para a replicação *ex vivo* e assumido um nicho único com variedade limitada de hospedeiros e necessidade de crescimento dentro de células. Portanto o bacilo depende de produtos metabólicos do

hospedeiro, o que poderia explicar o longo período de crescimento, incubação e a incapacidade de crescer em cultura (COLE *et al.*, 2001). O genoma do *M. leprae* inclui 1605 genes codificando proteínas e 50 genes para moléculas estáveis de RNA (COLE *et al.*, 2001).

Mycobacterium leprae é um parasita intracelular obrigatório com tropismo por macrófagos e células de Schwann de nervos periféricos, onde normalmente são observados em aglomerados ou globias. A temperatura ótima de crescimento do bacilo é de 27 a 30°C, característica refletida clinicamente pelos principais sítios afetados pela doença serem regiões mais frias do corpo como extremidades dos membros e da face (HASTINGS *et al.*, 1988).

Classificação clínica da Hanseníase

A hanseníase apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas. Várias classificações já foram propostas que, em comum, caracterizam a doença em dois pólos opostos estáveis dependentes da resposta imune do hospedeiro. O conceito de polaridade da hanseníase nas formas tuberculóide (TT) ou lepromatosa (LL), foi primeiramente estabelecido pelo dermatologista brasileiro Francisco Eduardo Rabello (1905-1989) (RABELLO; RABELLO JR, 1938). Em 1953, no Congresso de Leprologia de Madrid, foi mantido o conceito de polaridade e acrescido um novo grupo (borderline), definido como formas interpolares clinicamente instáveis e que evoluíam para o polo lepromatoso se não fossem tratadas (BASOMBRIIO *et al.*, 1953). A atual classificação clínica da hanseníase foi descrita por Ridley e Jopling (1966), na qual propuseram uma modificação na classificação de Madrid, subdividindo o grupo borderline em borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatosa (BL). Em todas as classificações é citada uma hanseníase indeterminada (I) que é considerada um estágio inicial da doença e possui um desenvolvimento variado. Em aproximadamente três quartos dos pacientes classificados como forma indeterminada, a doença é curada espontaneamente; alguns casos se mantêm indeterminados por um grande período, e alguns progridem para uma das formas estabelecidas da doença (HASTINGS *et al.*, 1988).

A reação do sistema imunológico do hospedeiro é de grande importância na defesa contra a infecção e na progressão clínica da hanseníase. A maioria dos indivíduos expostos a infecção são naturalmente protegidos e capazes de demonstrar uma resposta imune eficiente, não adoecendo. Entre os indivíduos que são acometidos pela doença a apresentação no espectro clínico é subdividida de seguinte maneira: Na extremidade tuberculóide observa-se uma forte resposta imune celular específica ao *M. leprae*, com participação de linfócitos

principalmente do tipo Th1, lesões caracterizadas por granulomas epitelioides, contenção e destruição de células infectadas e poucos bacilos BAAR. Nestes pacientes o número de lesões é escasso e são determinadas por bordas bem definidas, porém o dano a tecidos e nervos são comuns, a morte das células infectadas, principalmente células de Schwann responsáveis pela produção de mielina em nervos periféricos, leva à perda da sensibilidade, característica marcante da doença. Na outra extremidade lepromatosa, a resposta específica é ausente, com lesões difusas caracterizadas por macrófagos não diferenciados, poucas células T predominantemente do tipo Th2 com produção de anticorpos e grande número de bacilos BAAR (YAMAMURA *et al.*, 1991). A ampla distribuição de lesões difusas infiltradas com grande número de bacilos nestes indivíduos determina a este grupo a maior capacidade de transmissão da doença. No espectro borderline intermediário entre as formas polares, observa-se diferentes graus de resposta imune mediada por células. A hanseníase borderline pode desenvolver com o tempo características clínicas, bacteriológicas, e histopatológicas mais semelhantes com a doença tuberculóide, denominado “upgrading”, enquanto o desenvolvimento de características mais semelhantes com a doença lepromatosa é chamado “downgrading” (RIDLEY; JOB, 1985).

Sobrepondo a classificação clínica espectral da hanseníase impõe-se ainda, os chamados "estados reacionais" que podem ocorrer durante o curso natural da doença, durante o tratamento e mesmo após o tratamento, quando o paciente é considerado curado (NAAFS, 1994).

As reações hansênicas podem ser definidas como manifestações clínicas agudas resultantes de alterações no balanço imunológico entre o hospedeiro e o *M. leprae* (SAMPAIO; SARNO, 1998). Estes episódios agudos, que afetam principalmente pele e nervos, são a principal causa de morbidade e incapacidade da função do nervo periférico, e são classificados em dois tipos: reação Tipo 1 e reação Tipo 2 (RIDLEY, 1969)

Reação Tipo 1 ou reação reversa ocorre frequentemente em paucibacilares, e parece estar associada com um aumento abrupto da resposta imune mediada por célula contra antígenos do *M. leprae*. É uma reação de hipersensibilidade tardia associada ao "clearance" bacilar das lesões e ascensão no espectro em direção ao polo tuberculóide (FLEURY, 1989). A reação Tipo 2 ou reação tipo eritema nodoso hansênico (ENH) é caracterizada por uma reação inflamatória sistêmica, apresentando imunologia mais complexa. Normalmente ocorre em pacientes multibacilares, LL e BL, tratados ou não. Em alguns pacientes, pode ocorrer um ou mais episódios, ou então se tornar crônica e aparecer mesmo após o término do tratamento. Ainda é possível a ocorrência de reações mistas, principalmente nos pacientes borderline-

lepromatosos (NAAFS, 1994).

A intensidade da resposta imune celular específica ao *Mycobacterium leprae* pode ser estimada por meio do teste de Mitsuda originando uma reação de hipersensibilidade tardia, tipo granulomatosa, associando a hiperreatividade imunológica (Mitsuda positivo) com o polo tuberculóide e a ausência de reatividade (Mitsuda negativo) com o polo lepromatoso. O teste de Mitsuda baseia-se principalmente na reatividade do paciente à injeção intradérmica com lepromina, uma suspensão de bacilos *M. leprae* mortos pelo calor. A reação tardia à lepromina é medida em aproximadamente 4 semanas e reflete a indução da resposta imune celular frente ao *M. leprae*, manifestada pela formação de um granuloma celular epitelial organizado (HARBOE, 1985). A reatividade à lepromina possui quase nenhum valor de diagnóstico, mas estabelece o perfil imunológico do indivíduo frente ao *M. leprae* e, portanto possui valor prognóstico (HASTINGS *et al.*, 1988).

O diagnóstico da hanseníase é clínico e é baseado na apresentação de um dos três principais sinais que são: manchas avermelhadas ou hipopigmentadas com perda de sensibilidade, troncos nervosos espessados e presença de BAAR em esfregaço dérmico ou em amostra de biópsia (WHO, 2000). O exame clínico dermatoneurológico e a baciloscopia ainda são considerados o padrão ouro de diagnóstico em hanseníase, e seu resultado é importante para identificar os pacientes de maior carga bacilar e com maior risco de recidivas. O exame de baciloscopia ou índice baciloscópico (IB) procede da coleta de esfregaço dérmico dos lóbulos auriculares, cotovelos e de áreas infiltradas, e após a realização de procedimentos laboratoriais, o resultado é negativo quando nenhum bacilo é encontrado em cem campos e é positivo quando se encontra pelo menos um bacilo em cem campos examinados. Como na coloração de BAAR são necessários no mínimo 100.000 bacilos por grama de tecido para detecção confiável (SHEPARD; McRAE, 1968), a sensibilidade é baixa, principalmente em pacientes com características tuberculóides da doença, onde os bacilos são raros ou ausentes.

Para fins de tratamento foi adotada a classificação operacional da Organização Mundial de Saúde (OMS) que divide os pacientes em Paucibacilares (PB), quando apresentam cinco ou menos lesões e/ou apenas um tronco nervoso acometido, ou Multibacilares (MB) quando têm mais de cinco lesões e/ou mais de um tronco nervoso acometido. Em locais onde a baciloscopia em esfregaço dérmico pela coloração de Ziehl-Neelsen é disponível, os pacientes positivos para bacilos BAAR são classificados como MB, independente do número de lesões (WHO, 1982).

A hanseníase é uma doença curável e é tratada com uma combinação de drogas denominada poliquimioterapia (PQT). De acordo com as diretrizes da OMS, o tratamento de

pacientes MB consiste em: rifampicina (600 mg uma vez ao mês), clofazimina (300 mg uma vez ao mês e 50 mg diariamente) e dapsona (100 mg diariamente) por um período de 12 meses. Para pacientes PB o tratamento consiste em: rifampicina (600 mg uma vez ao mês) e dapsona (100 mg diariamente) por um período de 6 meses (WHO, 2000).

Situação atual da hanseníase

Eventos marcantes no controle da hanseníase como a introdução da poliquimioterapia (PQT) na década de 80 (WHO, 1982) e a resolução de 1991 da OMS para a eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública (WHO, 1991), contribuíram para promover o acesso global ao tratamento e notável redução da prevalência nas três últimas décadas.

No começo de 2011 a prevalência mundial era de 192.246 casos, no entanto 228.474 casos novos foram detectados durante 2010 (WHO, 2011), indicando que a infecção está ativa em regiões endêmicas apesar da eficiência do tratamento.

O Brasil continua como o segundo país mais afetado no mundo, com 34.894 casos novos, representado por 92% dos 37.740 casos novos detectados nas Américas durante 2010 (WHO, 2011).

Minas Gerais, no sudeste do Brasil, apresentou em 2010 um coeficiente de detecção de casos novos de 8/100.000 habitantes, abaixo do coeficiente geral brasileiro de 18,2/100.000 habitantes (BRASIL, 2010). Uberlândia é uma cidade com 604.013 habitantes (IBGE, 2011) localizada no oeste do estado de Minas Gerais. É uma região de alta endemia em hanseníase, com coeficiente de detecção de casos novos em 2010 de 10/100.000 habitantes e coeficiente de prevalência em 2010 de 0,55/10.000 habitantes (BRASIL, 2010).

Epidemiologia molecular da Hanseníase

As doenças infecciosas têm uma grande interface com a genética e biologia molecular de hospedeiros, parasitos e seus vetores, suas mutações, cepas e clones parasitários, imunogenética, patógenos e variações regionais de doenças e seu diagnóstico e tratamento, a ponto de ter sido criado uma nova disciplina: Epidemiologia Molecular. O desenvolvimento da epidemiologia molecular do *M. leprae* tem aberto novas perspectivas para o estudo, diagnóstico e terapêutica da hanseníase. As aplicações do estudo da epidemiologia molecular do *M. leprae* para compreender melhor a interação hospedeiro/parasita em nível individual e populacional com implicações na prevenção, diagnóstico e tratamento são promissoras. A

viabilidade e aplicabilidade de estudos epidemiológicos incorporando dados de biologia molecular, ainda são questionáveis porque dependem de técnicas que muitas vezes não permitem a inclusão de um número grande de indivíduos, o que torna complicado inferir resultados a partir de dados observados (HULKA *et al.*, 1990). No entanto, para dar consistência ao estudo da epidemiologia molecular de doenças infecciosas, é fundamental que os achados sejam repetidos em outros estudos e conduzidos em grupos diferentes de população.

A infecção e disseminação da doença não estão completamente elucidadas. Pesquisas anteriores demonstraram que o trato respiratório superior, seja mucosa bucal (MARTINEZ *et al.*, 2011) ou mucosa nasal (PATROCÍNIO *et al.*, 2005; NAVES *et al.*, 2009), tem um importante papel na fisiopatologia da hanseníase, participando diretamente como uma porta de entrada e saída do bacilo (BEYENE *et al.*, 2003; DAVEY; REES, 1974; JOB, 1990; MCDOUGALL, 1975; REES; MCDOUGALL, 1977; PATTYN *et al.*, 1993). Além disso, a doença nasal pode preceder lesões na pele em meses ou anos, dependendo da resposta imunológica celular e humoral do hospedeiro (GOULART *et al.*, 2002; PATROCÍNIO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008).

O contato com pacientes é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da hanseníase (BAKKER *et al.*, 2006; FINE *et al.*, 1997; GOULART *et al.*, 2008; VAN BEERS *et al.*, 1999; WALLACE *et al.*, 2003); portanto, a triagem deste grupo é importante para a detecção de casos novos e interrupção da transmissão da doença.

Em virtude da dificuldade de encontrar bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) através de métodos histopatológicos nas fases iniciais da doença, o principal avanço no diagnóstico laboratorial da hanseníase nos últimos 20 anos tem sido o desenvolvimento de métodos de extração, amplificação e identificação do DNA do *M. leprae* em amostras clínicas, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (SCOLLARD *et al.*, 2006).

A PCR tem sido usada com sucesso na detecção de pequenas quantidades de bacilos presentes nos tecidos (DONOGHUE *et al.*, 2001), sua rápida, específica e sensível identificação do microorganismo, que pode ser feita analisando amostras biológicas brutas, sem a necessidade de cultura do mesmo, é muito importante quando tratamos de microrganismos como o *M. leprae*, cuja cultura é difícil (KANG *et al.*, 2003).

Estudos relatam o uso da PCR para determinar a presença do DNA de *Mycobacterium leprae* em swabs nasais de pacientes, contatos e população endêmica (PATTYN *et al.*, 1993,

PATROCÍNIO *et al.*, 2005, DE WIT *et al.*, 1993), que pode estar relacionada com a dispersão do bacilo em regiões endêmicas. Outros estudos inferem a existência de portadores saudáveis ou infecção subclínica com presença transitória de bacilos na secreção nasal (BEYENE *et al.*, 2003, HATTA *et al.*, 1995, RAMAPRASAD *et al.*, 1997, JOB *et al.*, 2008, KLATSER *et al.*, 1993), indicando que o *M. leprae* é altamente infeccioso e que esses indivíduos podem exercer um papel ativo na transmissão para pessoas não protegidas.

Os estudos imunológicos também são de grande importância na epidemiologia da hanseníase. A reatividade sorológica a antígenos do *M. leprae* foi demonstrada como uma ferramenta efetiva para avaliar a exposição e infecção (CHO *et al.*, 2001; DUTHIE *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2010; OSKAM *et al.*, 2003; LOBATO *et al.*, 2011).

O principal antígeno do *M. leprae* até hoje relatado é o glicolípido fenólico I (PGL-I), um antígeno imunogênico e específico de superfície celular, pertencente ao grupo dos antígenos frouxamente ligados. Sua extração é possível com solventes do tipo clorofórmio e metanol. Trata-se de um micosídeo específico da parede celular do *M. leprae*, cuja molécula é composta de um esqueleto de fitiocerol, com duas cadeias laterais de ácidos micocerosídicos, ligado a uma estrutura trissacarídea, por um radical fenólico. Outras espécies micobacterianas possuem antígenos glicolípidos, mas eles diferem entre si por sua porção carboidrato, que é o determinante antigênico da molécula (HUNTER; BRENNAN, 1981; FUJIWARA *et al.*, 1984). O determinante antigênico do PGL-1 é representado pelo resíduo terminal trissacarídeo (BRENNAN; BARROW, 1980).

A técnica imunológica ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) já demonstrou que a produção de anticorpos anti PGL-I tem relação com o espectro clínico da hanseníase, é um marcador imunológico para a carga bacilar e também uma ferramenta auxiliar na classificação de pacientes (YAMASHITA *et al.*, 1996). A presença de anticorpos contra o PGL-I em contatos e em população sadia indica disseminação do bacilo em comunidades endêmicas (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; DOUGLAS *et al.*, 2004; GOULART; GOULART, 2009; MOURA *et al.*, 2008). Por se tratar de uma doença crônica, o principal anticorpo na detecção da hanseníase é o IgM anti PGL-I, no sangue periférico a concentração de destes anticorpos é grande devida à ativação da resposta humoral que aumenta com o decorrer do tempo devido à multiplicação do bacilo e a dificuldade dos macrófagos na eliminação do antígeno PGL-I do organismo devido a sua hidrofobicidade (MILER *et al.*, 1987).

JUSTIFICATIVA

Vários indicadores e estratégias para a epidemiologia e controle da hanseníase têm sido avaliados em diversos estudos, incluindo métodos moleculares e imunológicos para a detecção do *M. leprae*, definição de portadores sadios e de infecção subclínica, porém com resultados controversos devido à alta complexidade da doença e metodologias utilizadas (GOULART; GOULART, 2008).

A insuficiência do atual esquema terapêutico como ação na redução da incidência da hanseníase demonstra que a eliminação da doença como problema de saúde pública, proposta pela OMS, depende de uma intervenção incisiva sobre a interrupção da cadeia de transmissão, uma vez que não há prevenção primária para a hanseníase.

A cadeia de transmissão é pouco entendida. Possivelmente, existe um número não definido de pessoas que poderiam ser portadores sadios ou mesmo estarem infectadas, assintomáticas e que poderiam exercer papel ativo na transmissão da doença.

Do ponto de vista do paciente, o longo período de incubação da doença, seus sintomas e sinais insidiosos, podem levar à dificuldades no diagnóstico dos casos iniciais paucibacilares. Essa situação reforça a idéia que existe uma prevalência oculta, o que além de ocasionar incapacidades ao doente, vai influir na manutenção da cadeia de transmissão.

A aplicação de testes genéticos como a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* e imunológicos como o ELISA anti PGL-I tornaria possível identificar comunicantes suscetíveis entre os contatos domiciliares, definindo portadores sadios e infecção subclínica, delimitando grupos-alvo com maior risco de desenvolver a doença, para novas estratégias de prevenção (GOULART; GOULART, 2008).

A combinação de métodos que possam medir a imunidade humoral, diretamente proporcional à carga bacilar, por meio do teste ELISA anti PGL-I; a imunidade celular, pelo teste de Mitsuda, inversamente proporcional à carga bacilar; bem como avaliar diretamente a carga bacilar em swabs nasais, o principal sítio de entrada e saída do bacilo, por meio da PCR específica para DNA do *M. leprae*, poderá contribuir para o entendimento da epidemiologia molecular do *M. leprae* (GOULART *et al.*, 2008).

Mais estudos são necessários particularmente sobre a transmissão do *M. leprae*, o papel da infecção subclínica e a progressão da infecção à doença, o que possibilitaria subsidiar a recomendação da quimioprofilaxia em países de alta endemicidade.

HIPÓTESE

Mesmo em área de média endemia em hanseníase, como na região do Triângulo Mineiro onde foi desenvolvido o presente trabalho, há indivíduos portadores sadios do *M. leprae* e com infecção subclínica envolvidos na disseminação do bacilo na comunidade, aumentando as chances de contato do mesmo com os indivíduos suscetíveis.

A detecção do bacilo por meio de biomarcadores moleculares e imunológicos, que trazem segurança e confiabilidade quanto à especificidade e sensibilidade do método para detecção do *M. leprae*, poderá oferecer um índice de infectividade do meio e da circulação do bacilo na população, que pode ser monitorado em fase de eliminação da doença.

OBJETIVO

Caracterizar a epidemiologia molecular do *M. leprae* na população de área endêmica de hanseníase no sudeste do Brasil, por meio da detecção de DNA do bacilo em swab nasal e sorologia anti PGL-I em doentes e contatos domiciliares.

Objetivos Específicos:

- 1- Detectar o DNA do *M. leprae* por PCR em swabs nasais de pacientes com hanseníase virgens de tratamento e de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, correlacionando os resultados dos pacientes com a classificação clínica e operacional, índice baciloscópico, teste de Mitsuda e ELISA anti PGL-I e em contatos correlacionando os resultados com a classificação clínica e operacional do caso índice e resultados do teste ELISA anti PGL-I.
- 2- Detectar anticorpos IgM contra o antígeno PGL-I específico do *M. leprae* em soro de pacientes com hanseníase virgens de tratamento e de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, correlacionando os resultados dos pacientes com a classificação clínica e operacional, índice baciloscópico, teste de Mitsuda e PCR em swab nasal e em contatos correlacionando os resultados com a classificação clínica e operacional do caso índice e resultados da PCR em swab nasal.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

CASUÍSTICA

Seleção dos pacientes

Foram convidados a participar do estudo 444 pacientes virgens de tratamento do Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Seleção dos contatos domiciliares

Foram convidados a participar do estudo 1352 contatos domiciliares de pacientes com hanseníase atendidos no Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), do Hospital de Clínicas (HC), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

Aspectos Éticos

Este estudo é parte de uma investigação epidemiológica realizada pelo Centro Nacional de Referência em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), MG, Brasil. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia (nº 099/2003 e nº 499/2008).

Os pacientes e contatos que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual foram orientados que poderiam desistir da pesquisa a qualquer momento sem que houvesse prejuízo próprio.

MÉTODOS

Critérios para Seleção dos Pacientes

Para o diagnóstico clínico, os pacientes virgens de tratamento foram submetidos a

exames dermatoneurológicos, com descrição detalhada das características macroscópicas, quantidade e distribuição, das lesões mapeadas em diagrama corporal contido nos prontuários. Em todos os pacientes ainda foram realizados o teste de Mitsuda, índice baciloscópico de esfregaço dérmico e biópsias das lesões para exame histopatológico.

Teste de Mitsuda

Reação intradérmica com 0,1 ml da lepromina humana, uma suspensão de 6×10^7 bacilos/ml mortos pelo calor, produzida pelo Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL, Bauru-SP), realizada na superfície de flexão do antebraço direito, 4 cm abaixo da dobra antecubital, com leitura na 4ª semana, considerando como resultado, a medida do diâmetro da induração local, registrada em milímetros (mm). A administração do teste foi realizada após a coleta da amostra para a sorologia ELISA anti PGL-I. A reação de Mitsuda foi descrita levando-se em conta os dados relacionados abaixo:

Negativo: nada a observar ou pápula menor do que 3 mm de diâmetro

Positivo: nódulo maior que 3 mm de diâmetro ou com ulceração.

Índice Baciloscópico (IB)

O índice baciloscópico foi realizado em esfregaços cutâneos de no mínimo 7 locais: o lóbulo das 2 orelhas, os 2 cotovelos, 2 joelhos e lesões em atividade. A coloração de Ziehl-Neelsen foi utilizada pela característica bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) do *Mycobacterium leprae*. O resultado foi registrado de acordo com a presença de bacilos vistos em um campo microscópico médio, utilizando-se objetiva de imersão como descrita abaixo:

Negativo: nenhum bacilo em 100 campos de imersão

Positivo: acima de 1 bacilo em um campo de imersão

Critérios para Seleção dos Contatos Domiciliares

Os contatos domiciliares dos pacientes de hanseníase apresentaram exame clínico dermatoneurológico normal.

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), considera-se contato domiciliar de paciente de hanseníase os indivíduos que residam ou tenham residido com o doente nos últimos cinco anos (período médio de incubação da doença). O paciente com hanseníase

referente ao contato domiciliar foi denominado caso índice.

PCR em Swab Nasal

A coleta dos swabs nasais dos contatos de pacientes com hanseníase foi realizada com a introdução de pequenas escovas flexíveis e esfregando o septo nasal em ambas as fossas nasais. As hastes com o material foram depositadas em tubos estéreis contendo 500 µL de tampão de lise (NaCl 400 mM, EDTA 50 mM e Tris-HCl 25 mM, pH 8.0). Cada amostra foi individualmente acondicionada em microtubos eppendorf estéreis e mantidas a 4°C até a extração de DNA no Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do CREDESH.

Para a extração do DNA as amostras foram incubadas a 65°C/ 5h em uma solução de Proteinase K (10 mg/ml). Um volume igual de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (24:24:1) foi adicionado, homogeneizado com o produto lisado, colocado em repouso por 10 min. e centrifugado (15.000G a 4°C) durante 10 min. Após, a fase aquosa (até 600µl) foi coletada e depositada em um tubo limpo estéril. Para a precipitação do DNA, 1.000µl de álcool etílico absoluto foi adicionado, homogeneizado por inversão e os tubos centrifugados (15.000G a 4°C) por 15 min.. Os sedimentos foram lavados com álcool etílico 75% por centrifugação (7.500G a 4°C) durante 5 min. e suspensos em 50µl de água ultrapura deionizada. Para a detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal, um par de iniciadores (forward: 5' GCA CGT AAG CAT GTC GGT GG 3' e reverso: 5' CCG CGG CGC TAA CAA CTA TC 3') com alvo a região RLEP3 (X17153) do genoma do *M. leprae* foi utilizado para amplificar um fragmento de 130 pb, utilizando condições padronizadas para a PCR previamente descritas (GOULART *et al.*, 2007). Condições da PCR: 1,0 U de Taq Platinum DNA polymerase, 1X PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 10,0 pM de cada primer, e 200 ng de DNA genômico, em um volume final de 25 µL, completado com água ultrapura. A PCR foi realizada em termociclador MJ Research, Inc., de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos de amplificação a 95 °C por 40 s, 57 °C por 40 s, e 72 °C for 1 min. A extensão final foi feita a 72 °C por 10 min. Um controle positivo para DNA foi amplificado simultaneamente utilizando um par de iniciadores com alvo um fragmento de 200 pb do gene humano NRAMP1 (proteína 1 de macrófago associada à resistência natural). Os produtos da PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

Sorologia ELISA anti PGL-I

Para obtenção do soro foi realizada a coleta de sangue venoso periférico por punção da veia braquial com tubo em vácuo com gel separador (Vacutainer®).

Para detectar anticorpos IgM no soro, um ensaio de ligação imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay - ELISA) contra a molécula PGL-I nativa purificada da parede celular do *Mycobacterium leprae*, doado pelo Dr. John Spencer (Colorado State University, USA), foi realizado conforme metodologia previamente descrita (LOBATO *et al.*, 2011). Resumidamente, 50 µl de PGL-I 10 µg/ml diluído em álcool etílico absoluto foi adicionado a cada poço de uma placa de 96-poços (Maxisorp®, Nunc). Após incubação em temperatura ambiente, 300 µl de BSA-PBS 1% foi adicionado a cada poço e a placa incubada a 37°C/ 1h. Os poços foram lavados duas vezes com PBS e 50 µl de amostras de soro diluídas 1:100 em 1% BSA-PBS foram adicionados, e a placa incubada a 37°C/ 1h. Então os poços foram lavados seis vezes com PBS, incubados com 50 µl do conjugado de anti-IgM humana e peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), diluído 1:10.000 em 1% BSA-PBS à 37°C/ 1h, e lavado seis vezes com PBS. Após, 50 µl do substrato enzimático dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) foi adicionado e a placa incubada no escuro em temperatura ambiente até a coloração. A reação foi interrompida com 25 µl de ácido sulfúrico 4N e mensurada com um espectrofotômetro à 492nm. Cada amostra foi testada em duplicata. Os resultados do ELISA foram analisados com base no índice ELISA, um procedimento utilizado quando o anticorpo alvo não está presente em todas as amostras e os valores negativos são utilizados para normalizar as informações de diferentes ensaios e reduzir variações entre os testes. O cálculo do valor do ponto de corte foi realizado adicionando quarto desvios padrões (4 DP) na média da densidade ótica (DO), de três amostras em branco (sem amostra) e três amostras de controles negativos por placa, que foi definida para cobrir um intervalo de confiança de 99.99%. As amostras controle negativas foram estabelecidas previamente com indivíduos sem história de hanseníase, com PCR negativa (em sangue, esfregaço dérmico, swab nasal e bucal) e com soro negativo para anticorpos anti PGL-I. Dois controles positivos também foram utilizados em cada placa para verificação após a normatização dos dados. Se o coeficiente de variação para os controles positivos foram maiores do que 2%, o ensaio foi considerado inadequado e repetido. A titulação dos anticorpos foi expressa como índice ELISA (IE) de acordo com a seguinte fórmula $IE = DO_{amostra} / DO_{ponto\ de\ corte}$. Valores acima de 1,1 foram considerados positivos.

Análises Estatísticas

Foi realizada estatística descritiva dos dados. Coeficientes de correlação de Pearson e testes de regressão foram obtidos para associar os resultados nos testes: baciloscopia, teste de Mitsuda, ELISA e PCR com as formas clínicas e classificação operacional. Foi considerada a significância estatística de $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados com o programa Prism 5 para Windows (©1997-2007 GraphPad Software Inc).

RESULTADOS

Pacientes com hanseníase

Os 444 pacientes com hanseníase eram predominantemente homens 57,9% (257/444) e apresentaram idade média de $47,9 \pm 15,7$ anos. Os pacientes multibacilares (MB) representaram 70,3% (312/444) e a principal forma clínica observada foi a BT (38,7%) (Tabela 1).

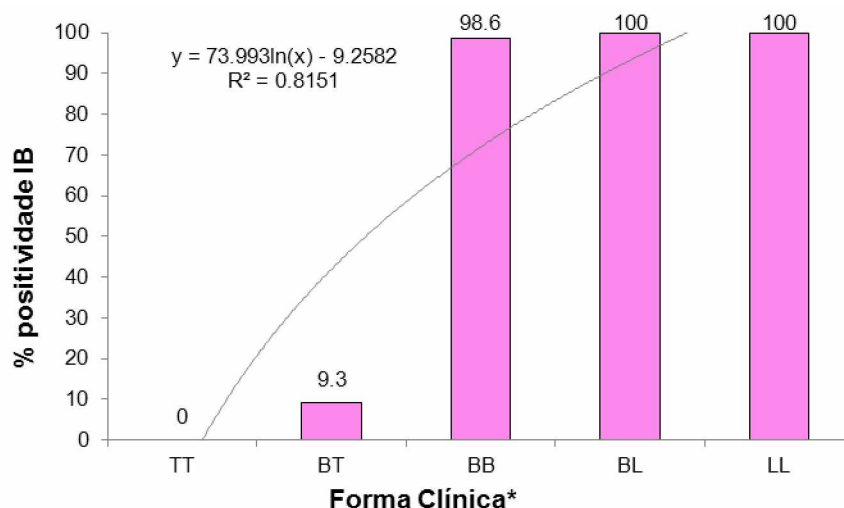
Tabela 1: Distribuição de frequências observadas nas formas clínicas, sexo e idade média de pacientes com hanseníase.

Formas Clínicas	Sexo				Idade no diagnóstico	Total	
	Masculino		Feminino			Média	N
	N	%	N	%			
I	2	40	3	60	36	5	1,1
TT	21	46,7	24	53,3	44	45	10,1
BT	86	50	86	50	46,4	172	38,7
BB	42	56,8	32	43,2	48,1	74	16,7
BL	44	69,8	19	30,2	56,4	63	14,2
LL	62	72,9	23	27	47,1	85	19,1
Total	257	57,9	187	42,1	47,9	444	100

* I: hanseníase indeterminada; TT: tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

Todos os pacientes PB foram negativos para o IB. Entre os MB (312), 76% (237) foram positivos. A distribuição das porcentagens de positividade de acordo com as formas clínicas foram nenhum para TT e 100% para BL (63) e LL (85) (Gráfico 1). Quando excluída a forma I devido a sua instabilidade, uma forte correlação positiva foi observada entre o IB e a classificação clínica (Pearson $r = 0,8826$, IC 95% 0,0012 até 0,9922, $p = 0,0474$, $R^2 = 0,8151$).

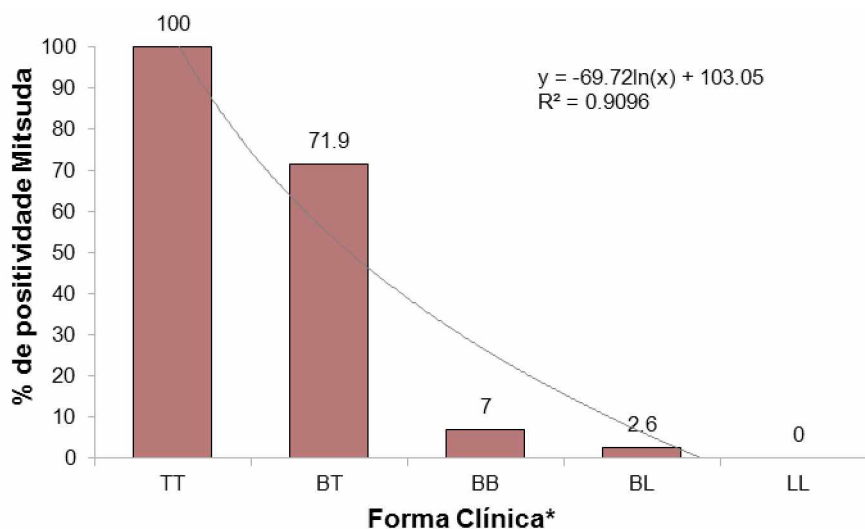
Gráfico 1: Porcentagens de positividade ao IB de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.



* TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

Os resultados do teste de Mitsuda foram recuperados de 328 pacientes. Não foi possível a análise dos resultados de Mitsuda de 116 pacientes que estavam sobre o uso de corticosteroides que interferiu no resultado do teste. Entre os pacientes com resultados, 34,8% (115) eram PB, desses 9,6% (11) foram negativos e 90,4% (104) foram positivos. As porcentagens para pacientes MB (213) foram 19,3% (41) positivos e 80,7% (172) negativos. A distribuição de porcentagens de positividade ao teste de Mitsuda de acordo com a classificação clínica foi de 100% (40/40) para TT e nenhum para LL (67) (Gráfico 2). Quando excluída a forma I devido a sua instabilidade, uma forte correlação negativa entre o teste de Mitsuda e a classificação clínica foi observada (Pearson $r = -0,9163$, IC 95% $-0,9946$ até $-0,1773$, $p = 0,0287$, $R^2 = 0,9096$).

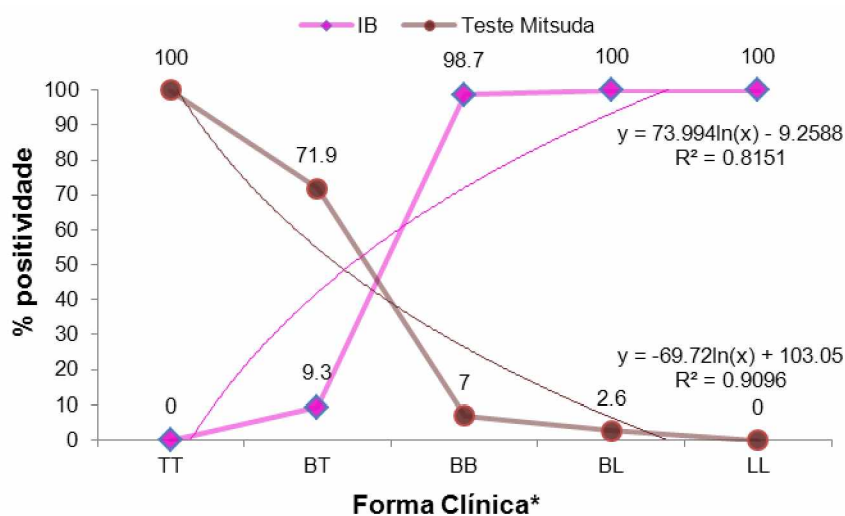
Gráfico 2: Porcentagens de positividade ao teste de Mitsuda de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.



* TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

A relação entre as porcentagens de positividade ao IB e ao teste de Mitsuda foi inversamente proporcional. A apresentação gráfica da porcentagem de positividade ao IB de acordo com as formas clínicas é melhor representada por uma regressão logarítmica positiva e ao teste de Mitsuda a melhor representação é uma regressão logarítmica negativa (Gráfico 3).

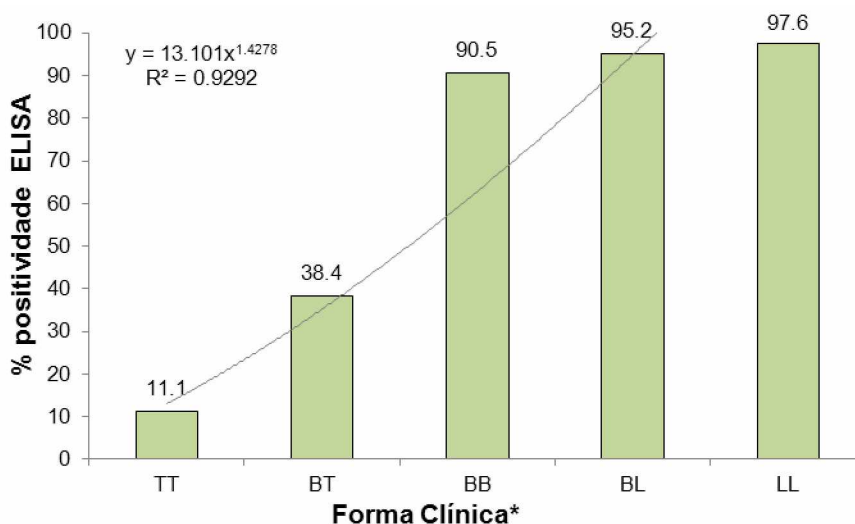
Gráfico 3: Linhas de tendência das porcentagens de positividade ao IB e teste de Mitsuda de pacientes com hanseníase de acordo com classificação clínica.



* TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

O teste ELISA para detecção de anticorpos IgM contra o PGL-I em pacientes com hanseníase apresentou uma positividade geral de 63,3% (281/444). A porcentagem de positividade entre pacientes MB foi de 83% (256/312), invertendo entre os PB, nos quais a porcentagem de negativos foi 83,3% (110/132). As porcentagens de positividade de acordo com a classificação clínica foram 11,1% (5/450) para TT e para LL 97,6% (83/85) (Gráfico 4). Quando excluída a forma I devido a sua instabilidade, uma forte correlação positiva foi observada entre o ELISA anti PGL-I e a classificação clínica (Pearson $r = 0,9210$, IC 95% 0,2063 até 0,9949, $p = 0,0263$, $R^2 = 0,9292$).

Gráfico 4: Porcentagens de positividade ao ELISA anti PGL-I de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.



* TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

A positividade geral para a detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de pacientes com hanseníase através da PCR (Figura 1) foi 34,2% (152/444). As porcentagens de positividade para pacientes PB e MB foram 5,3% (7/132) e 46,5 (145/312) respectivamente. De acordo com a classificação clínica as porcentagens de positividade foram 4,4% (2/45) para TT e para LL 91,8% (78/85) (Gráfico 5). Quando excluída a forma I devido a sua instabilidade, uma forte correlação positiva entre a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal e a classificação clínica foi observada (Pearson $r = 0,9693$, IC 95% 0,6008 até 0,9981, $p = 0,0064$, $R^2 = 0,9395$).

Gráfico 5: Porcentagens de positividade à PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.

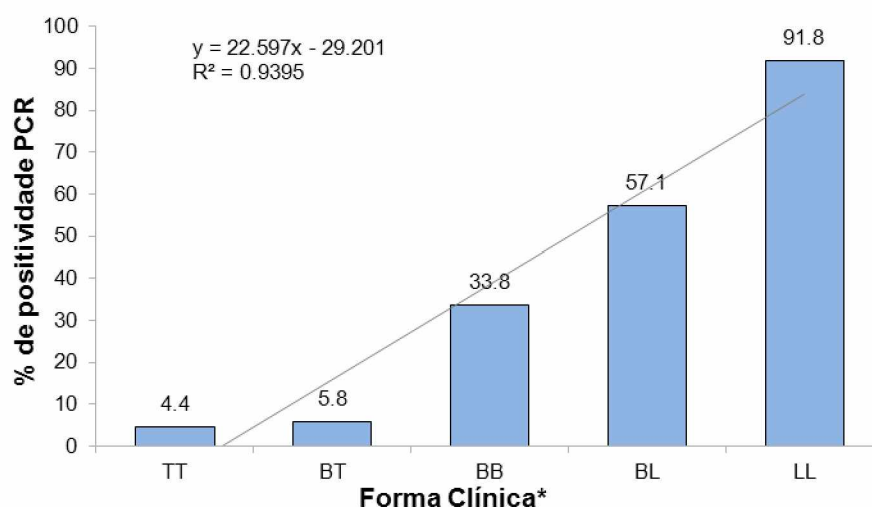
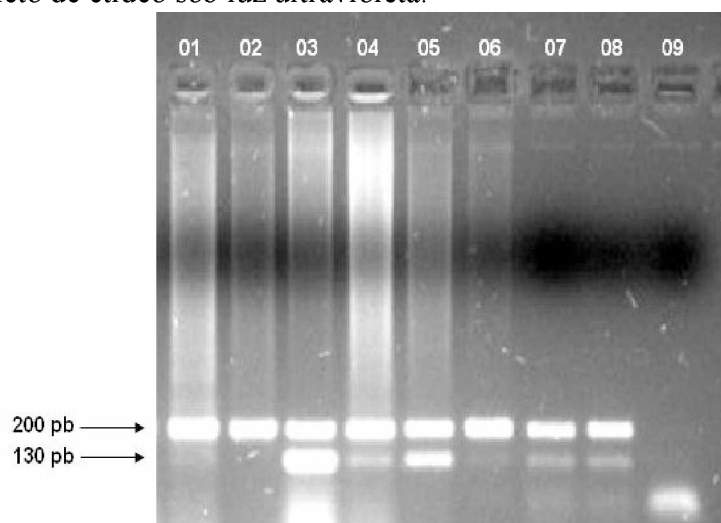


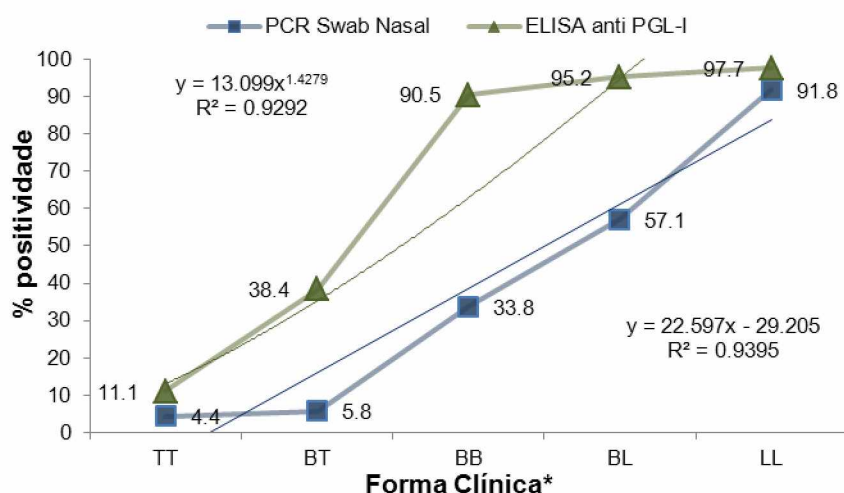
Figura 1: Visualização da detecção do DNA de *M. leprae* por eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo sob luz ultravioleta.



A detecção positiva do DNA de *M. leprae* é demonstrada pela amplificação de um fragmento de 130 pb da região genômica RLEP3. Colunas 01, 02 e 06 demonstram amostras negativas, colunas 03, 04, 05, 07 e 08 demonstram amostras positivas e a coluna 09 demonstra uma amostra controle negativa. O fragmento de 200 pb observado nas colunas 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07 e 08 demonstra a amplificação do gene NRAMP1 como controle positivo de DNA.

Em ambos os testes, ELISA anti PGL-I e PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal, as porcentagens de positividade aumentaram em direção as formas BB, BL e LL. A apresentação gráfica das porcentagens de positividade para o ELISA anti PGL-I melhor representa uma regressão geométrica e a detecção do DNA em swab nasal melhor representa uma regressão linear (Gráfico 6).

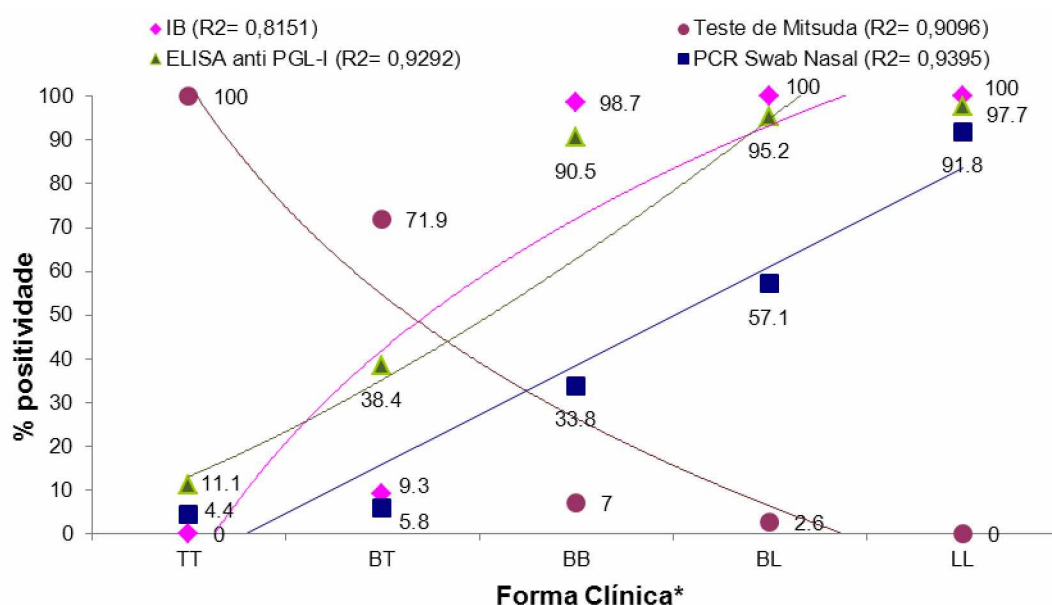
Gráfico 6: Linhas de tendência para as porcentagens de positividade aos testes ELISA anti PGL-I e PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.



* TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

A representação gráfica das linhas de tendência das porcentagens de positividade aos testes laboratoriais é apresentada no gráfico 7.

Gráfico 7: Linhas de tendência das porcentagens de positividade aos testes IB, Mitsuda, ELISA anti PGL-I e PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de pacientes com hanseníase de acordo com a classificação clínica.



* TT: hanseníase tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

Contatos de pacientes com hanseníase

Os 1352 contatos de pacientes eram predominantemente mulheres (56,2%) e menores de 16 anos (31,8%), com idade média de $29,3 \pm 19,9$ anos. Os contatos de pacientes MB representaram 77,6% (1049/1352) e a maioria eram contatos de pacientes com forma clínica BT 30,5% (412/1352) (Tabela 2).

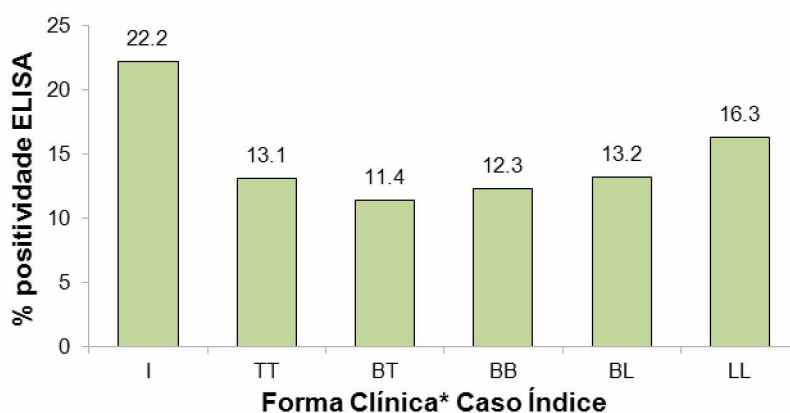
Tabela 2: Distribuição de frequências observadas nas formas clínicas do caso índice, sexo e idade média de contatos de pacientes com hanseníase.

Forma Clínica* do caso índice	Sexo				Idade na abordagem	Total	
	Masculino		Feminino			Média	N
	N	%	N	%			
I	3	33,3	6	66,7	19,1	9	0,7
TT	48	44,9	59	55,1	28,9	107	7,9
BT	189	45,9	223	54,1	28,5	412	30,5
BB	108	44,3	136	55,7	30,8	244	18
BL	90	37,3	151	62,7	28,6	241	17,8
LL	154	45,4	185	54,6	29,9	339	25,1
Total	592	43,8	760	56,2	29,3	1352	100

* I: hanseníase indeterminada; TT: tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

Foi observada uma positividade geral de 13,3% para o ELISA anti PGL-I em contatos. As porcentagens de positividade de acordo com a classificação operacional do caso índice foram 11,5% (35/303) para PB e 13,8% (145/1049) para MB. Quando excluída a forma I devido a sua instabilidade, uma correlação positiva foi observada entre o ELISA anti PGL-I e as formas clínicas do caso índice (Pearson $r=0,9163$, IC 95% 0,1775 até 0,9946, $p=0,0287$, $R^2=0,8397$) (Gráfico 8).

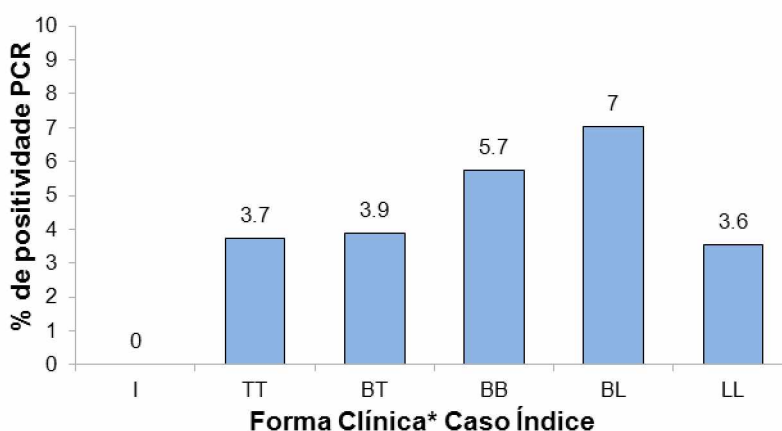
Gráfico 8: Porcentagens de positividade ao ELISA anti PGL-I em contatos de pacientes com hanseníase de acordo com a forma clínica do caso índice.



* I: hanseníase indeterminada; TT: tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

A detecção do por PCR do DNA de *M. leprae* em swab nasal de contatos apresentou uma positividade geral de 4,7% (63/1352). Entre os positivos, de acordo com a classificação operacional do caso índice 15,9% (10/63) eram contatos de casos PB e 84,1% (53/63) eram contatos de casos MB, porém a proporção de positivos não foi estatisticamente significativa quando levado em consideração o número total de contatos de pacientes PB ou MB (Gráfico 9).

Gráfico 9: Porcentagens de positividade à PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de contatos de pacientes com hanseníase de acordo com a forma clínica do caso índice.



* I: hanseníase indeterminada; TT: tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

As porcentagens de positividade para o ELISA anti PGL-I e para a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de contatos de pacientes com hanseníase, de acordo com a forma clínica dos casos índices são descritas na tabela 3. Não foi observada significância estatística entre a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de contatos e as formas clínicas dos casos índices ($p>0.05$).

Quando verificada a concordância de positividade entre o ELISA anti PGL-I e a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de contatos de pacientes com hanseníase foi observado que 17 indivíduos foram positivos para os dois testes (Tabela 4).

Tabela 3: Porcentagens de positividade para o ELISA anti PGL-I e a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal de contatos de acordo com a forma clínica dos casos índices.

Forma Clínica* do caso índice	ELISA anti PGL-I				PCR Swab Nasal				Total	
	Negativo		Positivo		Negativo		Positivo			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
I	7	77,8	2	22,2	9	100	-	-	9	0,7
TT	93	86,9	14	13,1	103	96,3	4	3,7	107	7,9
BT	365	88,6	47	11,4	396	96,1	16	3,9	412	30,5
BB	214	87,7	30	12,3	230	94,3	14	5,7	244	18
BL	210	86,8	32	13,2	225	93	17	7	241	17,8
LL	283	83,7	55	16,3	326	96,4	12	3,6	339	25,1
Total	1172	86,7	180	13,3	1289	95,3	63	4,7	1352	100

* I: hanseníase indeterminada; TT: tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline borderline; BL: borderline lepromatosa; LL: lepromatosa.

Tabela 4: Resultados para a sorologia ELISA anti PGL-I contra os resultados da PCR para a detecção do DNA de *M. leprae* em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase.

PCR swab nasal	ELISA anti PGL-I				Total	
	Negativo		Positivo			
	N	%	N	%	N	%
Negativo	1126	83,3	163	12	1289	95,3
Positivo	46	3,4	17	1,3	63	4,7
Total	1172	86,7	180	13,3	1352	100

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que em pacientes com hanseníase a positividade nos testes, ELISA anti PGL-I e PCR em swab nasal, estão diretamente associadas com as formas clínicas no espectro da doença, aumentando do polo TT em direção ao polo LL. Estes dados corroboram com estudos que afirmam uma correlação diretamente proporcional de positividade entre os níveis de anticorpos específicos do *M. leprae* com o espectro clínico e a baciloscopia, e inversamente proporcional ao teste de Mitsuda (GOULART *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2001; OSKAM *et al.*, 2003; BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; MOURA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008). A correlação diretamente proporcional entre a detecção do DNA de *M. leprae* e de anticorpos anti PGL-I com a positividade na baciloscopia de esfregaço dérmico, e inversamente proporcional ao teste de Mitsuda, demonstra uma infecção ativa e correta classificação dos pacientes.

Os resultados descritos indicam que a relação entre a resposta imunológica de acordo com a classificação operacional e a classificação em formas clínicas com a detecção de anticorpos IgM contra o PGL-I em soro e do DNA de *M. leprae* em swabs nasais de pacientes com hanseníase, validam as metodologias como ferramentas auxiliares para a classificação dos pacientes e viável aplicação na identificação de portadores sadios e com infecção subclínica entre contatos domiciliares.

Este estudo observou que aproximadamente 5% dos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase foram positivos para a detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal, similar a positividade encontrada em pacientes PB, TT e BT. Estes resultados demonstram que contatos domiciliares estão expostos a uma fonte de infecção e abrigam bacilos no nariz. Mesmo que a maioria dos contatos não seja infectada ou desenvolva hanseníase devido à complexa relação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais com o mecanismo de infecção (GOULART; GOULART, 2009), eles podem favorecer a disseminação do *M. leprae* para indivíduos suscetíveis, o que indica um possível meio de transmissão. Outros estudos detectaram DNA de *M. leprae* na mucosa nasal de população endêmica (HATTA *et al.*, 1995; BEYENE *et al.*, 2003) e a positividade observada, independente da classificação operacional e forma clínica do caso índice, apresenta mais evidência da distribuição generalizada de *M. leprae* em regiões endêmicas.

A positividade geral observada neste estudo para a PCR em swab nasal de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase correlaciona-se com porcentagens encontradas em estudos na Indonésia 2,9% (HATTA *et al.*, 1995), Índia 2% (RAMAPRASAD *et al.*, 1997),

Etiópia 4,6% (BEYENE *et al.*, 2003), Índia 4% (JOB *et al.*, 2008), Anjouan 6,5% (PATTYN *et al.*, 1993) e Indonésia 7,8% (KLATSER *et al.*, 1993), e é inferior a encontrada em estudos nas Filipinas 19% (DE WIT *et al.*, 1993). Estudos relatam a utilização de variadas metodologias e iniciadores com alvo diferentes regiões e com diversos tamanhos amplificados para a detecção específica do DNA de *M. leprae* (BEYENE *et al.*, 2003; PATTYN *et al.*, 1993; DE WIT *et al.*, 1993; HATTA *et al.*, 1995; JOB *et al.*, 2008; KLATSER *et al.*, 1993), porém a utilização de iniciadores que amplificam um fragmento de 130pb da região RLEP3, foi demonstrada ser mais sensível (GOULART *et al.*, 2007), justificando a aplicação dos mesmos no presente estudo.

Neste estudo mais do que 13% dos contatos domiciliares de pacientes com hanseníase foram soropositivos para anticorpos IgM anti PGL-I, porcentagem acima da observada entre pacientes TT. Esses resultados demonstram que estes contatos também apresentam maior prevalência de infecção, aumentando em direção às formas MB. Outros estudos indicam que a soropositividade entre os contatos representa um fator de risco para o desenvolvimento da doença, especialmente hanseníase MB (DOUGLAS *et al.*, 2004; GOULART *et al.*, 2008).

A soropositividade geral em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase observada nesta investigação corrobora com resultados de soropositividade obtidos em contatos na Índia (14,5%) (KRISHNAMURTHY *et al.*, 1991), Nova Caledônia (14,2%) (DESFORGES *et al.*, 1989), Albânia (13,3%) (SULÇEBE; NAKUÇI, 1990), Brasil-Rio de Janeiro (16,1%) (DUPPRE, 2008), Nepal (17%) (ROCHE *et al.*, 1993) e Polinésia (17%) (CHANTEAU *et al.*, 1993) ; e são superiores aos dados encontrados nas Filipinas (6,6%) (CELLONA *et al.*, 1993) e Índia (2,7%) (SINHA *et al.*, 2004). Portanto, a soropositividade para anticorpos contra antígenos do *M. leprae* em contatos domiciliares de pacientes tem variado de 2,7 a 17%. Essas diferenças de soropositividade encontradas entre os diversos trabalhos podem ser explicadas, pelo menos em parte, pela utilização de porções antigênicas sintéticas e não o antígeno nativo PGL-I purificado, como no presente trabalho. Outros estudos utilizam porções antigênicas sintéticas para a detecção de anticorpos contra o *M. leprae* em população de áreas endêmicas (DUTHIE *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2010; LOBATO *et al.*, 2011; BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003), porém sua validação é dependente da correlação com os resultados da sorologia anti PGL-I com o antígeno nativo, que melhor representa a reatividade imunológica frente à infecção no organismo hospedeiro, justificando a aplicação do mesmo no presente estudo.

CONCLUSÃO

A presença de bacilos na mucosa nasal de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, que pode ser mensurada pela detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal pela técnica da PCR, reflete contaminação como resultado do contato com uma fonte de infecção. A positividade na PCR pode representar apenas a presença do bacilo ou infecção subclínica, no entanto não indica evolução para a doença, uma vez que a mucosa nasal é o sítio primário de contato com qualquer microorganismo no ar. A presença de *M. leprae* em secreções nasais não determina infecção, ela indica o transporte nasal, o que pode implicar na participação desses indivíduos na transmissão da hanseníase como portadores saudáveis.

Não obstante, a contaminação pode levar à infecção, que pode ser determinada pela produção de anticorpos específicos contra antígenos do *M. leprae* pelo hospedeiro, levando a soropositividade ao ELISA anti PGL-I, o que em contatos domiciliares sem sinais ou sintomas de hanseníase, representa uma infecção subclínica. O número de soropositivos não indica a real frequência de infectados, uma vez que alguns dos infectados não produzem anticorpos específicos, o que sugere que o número de infectados pode ser subestimado.

Contatos domiciliares constituem um grupo reconhecível de indivíduos com alto risco para o desenvolvimento da doença e que vivem em proximidade com uma fonte de infecção (SALES *et al.*, 2011) e sua participação na propagação e disseminação de *M. leprae* para pessoas suscetíveis em comunidades endêmicas não pode ser negligenciada. A distribuição de positividade observada entre os contatos domiciliares de pacientes em todas as classificações operacionais e formas clínicas, indica que todos estão expostos a uma pressão bacilar e possível infecção devido à contínua interação com uma fonte de infecção e também que o *M. leprae* está amplamente disseminado entre eles.

Indivíduos bacilíferos não tratados, especialmente multibacilares, são altamente contagiosos e podem disseminar *M. leprae* na comunidade mesmo antes de apresentar sinais clínicos da doença (DAVEY; REES, 1974; MCDOUGALL *et al.*, 1975; GOULART *et al.*, 2002). A atual política mundial de controle da hanseníase garante que os indivíduos diagnosticados sejam tratados, porém a detecção de casos novos tem decrescido muito lentamente (WHO, 2011), sugerindo a existência de fontes de infecção não detectadas, particularmente em comunidades endêmicas. Como a positividade observada nos testes ELISA anti PGL-I e PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal foram maiores em pacientes multibacilares, é possível que contatos com positividade nesses testes possam

ser contagiosos e favorecer o contato do bacilo com pessoas suscetíveis, o que ajuda a explicar o surgimento de casos novos em pessoas que não reportam contato prévio com pacientes (BEYENE *et al.*, 2003; PATTYN *et al.*, 1993; GOULART *et al.*, 2008; GOULART; GOULART, 2009; HATTA *et al.*, 1995; KLATSER *et al.*, 1993).

O sucesso dos programas de controle da hanseníase se baseia na prevenção, diagnóstico precoce, tratamento e interrupção da transmissão. A vacinação com BCG têm contribuído como um fator de proteção para a hanseníase (SALES *et al.*, 2011); além disso, ensaios clínicos para a avaliação de novas vacinas aperfeiçoadas devem ser priorizados. Novas metodologias moleculares baseadas na PCR são mais específicas, sensíveis e reprodutíveis do que a microscopia ótica (TRUMAN *et al.*, 2008) e devem melhorar o diagnóstico precoce e correto. Trinta anos atrás a PQT foi implementada após a ocorrência de cepas de *M. leprae* resistentes à dapsona, assim devido à atual emergência de resistência medicamentosa às da PQT (MATSUOKA, 2010), é essencial a vigilância e a avaliação de tratamentos alternativos e com novas drogas devem ser incentivados.

As metodologias aplicadas neste estudo, PCR para detecção do DNA de *M. leprae* em swab nasal e sorologia anti PGL-I, são ferramentas que podem ser utilizadas para avaliar a distribuição da infectividade e a circulação do bacilo no meio. Como observado em outras doenças infecciosas nas quais poucos indivíduos infectados desenvolvem a doença, o papel dos portadores sadios e com infecção subclínica na disseminação da hanseníase é um possível meio de transmissão em regiões endêmicas. Em consequência disso, a quimioprofilaxia de contatos domiciliares deve ser implementada como prevenção para o desenvolvimento da doença em indivíduos com infecção subclínica e como uma estratégia para a eliminação dos bacilos em portadores sadios e subsequente interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase.

REFERÊNCIAS

- BAKKER, M. I.; HATTA, M.; KWENANG, A.; VAN MOSSEVELD, P.; FABER, W. R.; KLATSER, P. R.; OSKAM, L. Risk factors for developing leprosy - a population-based cohort study in Indonesia. **Lepr Rev**, v.77, n. 1, p. 48-61, 2006.
- BASOMBRIO, B.; COCHRANE, R. G.; PRIETO, J. G.; KHANOLKAR, V. R.; KITAMURA, K.; LATAPI, F.; RABELLO, F. E. A.; VEGAS, M.; WADE, H. W.; ARNOLD, H. Commission of classification – Draft Report of Classification Committee. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 6., Madrid, 1953. **Memoria...** Madrid: Gobierno de España y Asociacion Internacional de la Lepra, p. 75-86, 1953.
- BEYENE, D.; ASEFFA, A.; HARBOE, M.; KIDANE, D.; MACDONALD, M.; KLATSER, P. R.; BJUNE, G. A.; SMITH, W. C. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. **Epidemiol Infect**; v. 131, n. 2, p. 841-848, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da Hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Hanseníase: casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. 2010. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/hansenase/bases/Hansbrnet.def>> . Acesso em: 10 dez. 2011.
- BRENNAN, P. J.; BARROW, W. W. Evidence for Species species lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 48, n. 4, p. 382-387, 1980.
- BÜHRER-SÉKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; VAN LEEUWEN, J.; AMADOR S.; FUJIWARA, T.; KLATSER P. R.; OSKAM L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**, v.41, n.5, p.1991-1995, 2003.
- CELLONA, R. V.; WALSH, G. P.; FAJARDO, T. T. JR; ABALOS, R. M.; DELA CRUZ, E. C.; GUIDO-VILLAHERMOSA, L.; FELICIO-BALAGON, M. V.; STEENBERGEN, G. J.; DOUGLAS, J. T. Cross-sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu, The Philippines. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 61, n. 2, p. 192-198, 1993.
- CHANTEAU, S.; GLAZIOU, P.; PLICHART, C.; LUQUIAUD, P.; PLICHART, R.; FAUCHER, J. F.; CARTEL, J. L. Low predictive value of PGL-I serology for the early diagnosis of leprosy in family contacts: results of a 10-year prospective field study in French Polynesia. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 61, n. 4, p. 533-541, 1993.
- CHO, S. N.; CELLONA, R. V.; VILLAHERMOSA, L. G.; FAJARDO, T. T.; BALAGON, M. V.; ABALOS, R. M. Detection of phenolic glycolipid 1 of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.8, n.11, p.138-42, 2001.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R. M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M. A.; RUTHERFORD, K. M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J. R.; BARRELL, B. G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-1011, 2001.

DAVEY, T. F.; REES, R. J. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. **Lepr Rev**, v.45, n. 2, p. 121-134, 1974.

DESFORGES, S.; BOBIN, P.; BRETHES, B.; HUERRE, M.; MOREAU, J. P.; BACH, M. A. Specific anti-*M leprae* PGL-I antibodies and Mitsuda reaction in the management of household contacts in New Caledonia. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 57, n. 4, p. 794-800, 1989.

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

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M.. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. **J Med Microbiol**, v. 50, n. 2, p.177-182, 2001.

DOUGLAS, J. T.; CELLONA, R. V.; FAJARDO, T. T. JR; ABALOS, R. M.; BALAGON, M. V.; KLATSER, P. R. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 5, p. 897-900, 2004.

DUPPRE, N. C. Risco de desenvolver hanseníase em contatos de pacientes, segundo positividade ao teste anti PGL I e situação vacinal (BCG). 2008. f. Tese (doutorado acadêmico em Saúde Pública)-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

DUTHIE, M. S.; HAY, M. N.; RADA, E. M.; CONVIT, J.; ITO, L.; OYAFUSO, L. K. M.; MANINI, M. I. P.; GOULART, I. M. B.; LOBATO, J.; GOULART, L. R.; CARTER, D.; REED, S. G. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 10, p. 1257-1265, 2011.

FINE, P. E.; STERNE, J. A.; PONNINGHAUS, J. M.; BLISS, L.; SAUL, J.; CHIHANA, A.; MUNTHALI, M.; WARNDORFF, D. K. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **Am. J. Epidemiol.**, v.146, n. 1, p. 91-102, 1997.

FLEURY, R. N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling: uma análise morfológica. **Hansen Int.**, v.14, n.2, p.101-106, 1989.

FUJIWARA, T.; HUNTER, S. W.; CHO, S. N.; ASPINALL, G. O.; BRENNAM, P. J. Chemical Synthesis and serology of diasaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. **Infect. Immun** v. 43, n. 1, p. 245-252, 1984.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da Hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

GOULART, I. M. B.; CARDOSO, A. M.; SANTOS, M. S.; GONÇALVES, M. A.; PEREIRA, J. E.; GOULART, L. R. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. **Arch Dermatol Res**, v. 299, n. 5, p. 267-271, 2007.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Arch Dermatol Res**, v. 300, n. 6, p. 269-290, 2008.

GOULART, I. M. B.; SOUZA, D. O. B.; MARQUES, C. R.; PIMENTA, V. L.; GONÇALVES, M. A.; GOULART, L. R. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 1, p. 101-105, 2008.

GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Arch Dermatol Res**, v. 301, n. 2, p. 123-137, 2009.

HARBOE, M. The immunology of leprosy. In: **Leprosy**. HASTINGS, R C. Ed. Churchill Livingstone, New York, USA, p. 15-30, 1985.

HASTINGS, R. C.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; FRANZBLAU, S. G. Leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 3, p. 330-348, 1988.

HATTA, M.; VAN BEERS, S. M.; MADJID, B.; DJUMADI, A.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg**, v.89, n. 4, p. 381-385, 1995.

HULKA, B. S.; WILCOSKY, T. Biological markers in epidemiologic research. **Arch Environ Health**. v. 43, n. 2, p. 83-89, 1988.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel glycolipid from *M. leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J Bacteriol**, v. 147 n. 5, p.728-735, 1981.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). População 2010 Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibge/popmap.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2011.

JOB, C. K. Nasal mucosa and abraded skin are the two routes of entry of *Mycobacterium leprae*. **Star**, v. 49, n. 3, p. 1, 1990.

- JOB, C. K.; JAYAKUMAR, J.; KEARNEY, M.; GILLIS, T. P. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, n. 3, p. 518–521, 2008.
- KANG, T. J.; KIM, S. K.; LEE, S. B.; CHAE, G. T.; KIM, J. P. Comparision of two different PCR amplification products (the 18 k-Da protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. **Clin Exp Dermatol**, v. 28, n. 4, p. 420-424, 2003.
- KLATSER, P. R.; VAN BEERS, S.; MADJID, B.; DAY, R.; DE WIT, M. Y. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. **J Clin Microbiol**, v. 31, n. 11, p. 2947-2951, 1993.
- KRISHNAMURTHY, P.; RAO, P. S.; REDDY, B. N.; SUBRAMANIAN, M.; DHANDAYUDAPANI, S.; BHATIA, V.; NEELAN, P. N.; DUTTA, A. Seroepidemiological study of leprosy in a highly endemic population of south India based on an ELISA using synthetic PGL-I. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 59, n. 3, p. 426-431, 1991.
- LOBATO, J.; COSTA, M. P.; REIS, E. M.; GONÇALVES, M. A.; SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B.. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev**, v. 82, p. 1-14, 2011.
- MARTINEZ, T. S.; FIGUEIRA, M. M.; COSTA, A. V.; GONÇALVES, M. A.; GOULART, L. R.; GOULART, I. M. B. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. **Clin Microbiol Infect**, n.17, v. 11, p. 1653-1658, 2011.
- MARTINS, A. C.; MIRANDA, A.; OLIVEIRA, M. L.; BÜHRER-SÉKULA, S.; MARTINEZ, A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 76, n. 5, p. 579-587, 2010.
- MATSUOKA, M. Drug Resistance in Leprosy. **Jpn J Infect Dis**, v. 63, p. 1-7, 2010.
- MCDUGALL, A. C.; REES, R. J.; WEDDEL, A. G.; KANAN, M. W. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose, **J. Pathol.** v. 115, p. 215–226, 1975.
- MILER, R. A.; GORDER, D.; HARNICSH, J. P. Antibodies to phenolic glycolipid-1 during long long-term therapy: serial measurements in individual patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v.55, p 633-636, 1987.
- MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ARAOZ, R.; COPPÉE, J. Y.; LACROIX, C.; SOW, S.; SPENCER, J. S.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L.; GELBER, R.; VIRMOND, M.; FLAGEUL, B.; CHO, S. N.; JI, B.; PANIZ-MONDOLFI, A.; CONVIT, J.; YOUNG, S.; FINE, P. E.; RASOLOFO, V.; BRENNAN, P. J.; COLE, S. T. On the origin of leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, 2005.
- MONOT, M.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; ZIDANE, N.; SHERAFI, D.; PANIZ-MONDOLFI, A.; MATSUOKA, M.; TAYLOR, G. M.; DONOGHUE, H. D.; BOUWMAN, A.; MAYES, S.; WATSON, C.; LOCKWOOD, D.; KHAMESIPOUR, A.; DOWLATI, Y.; JIANPING, S.; REA, T. H.; VERA-CABRERA, L.; STEFANI, M. M.; BANU, S.; MACDONALD, M.; SAPKOTA, B. R.; SPENCER, J. S.; THOMAS. J.; HARSHMAN, K.;

- SINGH, P.; BUSO, P.; GATTIKER, A.; ROUGEMONT, J.; BRENNAN, P. J.; COLE, S. T. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1282-1289, 2009.
- MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L.; BÜHRER-SÉKULA, S. Leprosy Serology using PGL-I: A Systematic Review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 (Supl. 2), p. 11-18, 2008.
- NAAFS, B. Leprosy reactions: new knowledge. **Trop. Geogr. Med.**, v.46, n.2, p.80-84, 1994.
- NAVES, M. M.; PATROCÍNIO, L. G.; PATROCÍNIO, J. A.; MOTA, F. M. N.; SOUZA, A. D.; FLEURY, R. N.; GOULART, I. M. B. Contribution of nasal biopsy to leprosy diagnosis. **Am J Rhinol Allergy**, v. 23, n. 2, p. 177-180, 2009.
- OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S.. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: A state of the art overview. **Lepr Rev**, v. 74, n. 3, p. 196-205, 2003.
- PATROCÍNIO, L. G.; GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R.; PATROCÍNIO, J. A.; FERREIRA, F. R.; FLEURY, R. N. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v.44, p. 311–316, 2005.
- PATTYN, S. R.; URSI, D.; IEVEN, M.; GRILLONE, S.; RAES, V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 61, n. 3, p. 389–393, 1993.
- RABELLO, E.; RABELLO JR, F. Une classification clinico-epidemiologique des formes de la lèpre. **Rev Bras Leprae**, v. 6, n. 3, p. 229-243, 1938.
- RAMAPRASAD, P.; FERNANDO, A.; MADHALE, S.; RAO, J. R.; EDWARD, V. K.; SAMSON P. D.; KLATSER, P. R.; DE WIT, M. Y.; SMITH, W. C.; CREE, I. A. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. **Lepr Rev**, v. 68, n. 4, p. 301-15, 1997.
- REES, R. J. W.; MCDOUGALL, A. C. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. **J. Med. Microbiol.** v.10, p.63–68, 1977.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v.34, p. 255-273, 1966.
- RIDLEY, D. S. Reactions in leprosy. **Lepr. Rev.**, v.40, p.77-81, 1969.
- RIDLEY, D. S.; JOB, C. K. The pathology of leprosy. In: **Leprosy**. HASTINGS, R. C. Ed. Churchill Livingstone, New York, p. 100–133, 1985.
- ROBBINS, G.; TRIPATHY, V. M.; MISRA, V. N.; MOHANTY, R. K.; SHINDE, V. S.; GRAY, K. M.; SCHUG, M. D. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5669, 2009.

ROCHE, P. W.; BRITTON, W. J.; FAILBUS, S. S.; NEUPANE, K. D.; THEUVENET, W. J. Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 61, n. 1, p. 35-43, 1993.

SALES, A. M.; LEON, A. P.; DUPREE, N. C.; HACKER, M. A.; NERY, J. A. C.; SARNO, E. N.; PENNA, M. L. F. Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e1013, 2011.

SAMPAIO, E. P.; SARNO, E. N. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.31, p.69-76, 1998.

SCOLLARD, D. M.; ADAMS, L. B.; GILLIS, T. P.; KRAHENBUHL, J. L.; TRUMAN, R. W.; WILLIAMS, D. L. The continuing challenges of leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n. 2, p. 338-381, 2006.

SHEPARD, C. C.; MCRAE, D. H. A method for counting acid-fast bacteria. **Int. J. Lepr**. v. 36, n. 1, p.78-82, 1968.

SILVA, G. M.; PATROCINIO, L. G.; PATROCINIO, J. A.; GOULART, I. M. B. Otorhinolaryngologic Evaluation of Leprosy Patients Protocol of a National Reference Center. **Int Arch Otorhinolaryng**, v. 12, n. 1, p. 77-81, 2008.

SINHA, S.; KANNAN, S.; NAGARAJU, B.; SENGUPTA, U.; GUPTE, M. D. Utility of serodiagnostic tests for leprosy: a study in an endemic population in South India. **Lepr Rev**, v. 75, n. 3, p. 266-273, 2004.

SULÇEBE, G.; NAKUÇI, M. Anti-phenolic glycolipid 1 IgM antibodies in leprosy patients and in their household contacts. **Lepr Rev**, v. 61, n. 4, p. 341-346, 1990.

TEIXEIRA, A. C.; CRUVINEL, D. L.; ROMA, F. R.; LUPPINO, L. F.; RESENDE, L. H.; SOUSA, T.; BÜHRER-SÉKULA, S.; GOULART, I. M. B. Evaluation of the agreement between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 (Supl. 2), p. 48-55, 2008.

TRUMAN, R. W.; ANDREWS, P. K.; ROBBINS, N. Y.; ADAMS, L. B.; KRAHENBUHL, J. L.; GILLIS, T. P. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 11, p. e328, 2008.

VAN BEERS, S. M.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implication for future control. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 67, n. 2, p. 119-128, 1999.

VOGELSANG, T. M. Gerhard Henrik Armauer Hansen 1841-1912. The discoverer of the leprosy bacillus. His life and his work. . **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 46, n. 4, p.257-332, 1978.

WALLACE, C.; CLAYTON, D.; FINE, P. Estimating the relative risk ratio for leprosy in Karonga District, Malawi. **Lepr. Rev**. v.74, p.133–140, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemotherapy of leprosy for control programmes.** Geneva, Technical Report Series, Nº 675, 1982. (Technical Report Series, n. 675).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy Resolution WHA 44.9.** Geneva, 1991. Presented at Forty-fourth World Health Assembly 1991, 13 May 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to the elimination of leprosy as a public health problem.** Geneva, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leprosy Update. **Weekly Epidemiological Record,** Geneva, n. 86, p. 389-400, 2011.

YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DENS, R. J.; WEINBERG, K.; REA, T. H.; BLOOM, B. R.; MODLIN, R. L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v.254, p. 277–279, 1991.

YAMASHITA, J. T.; MAEDA, S. M.; JABUR, R.; ROTTA, O. Artigo de Revisão: Hanseníase: Novos Métodos e Recursos Diagnósticos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.71 n.4, p.343-351, 1996.