



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



SÉRGIO ARAÚJO

EVIDÊNCIA MOLECULAR PARA A VIA AÉREA DE INFECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE*
E O PAPEL DOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS NA PERSISTÊNCIA DA HANSENÍASE

UBERLÂNDIA

2016

SÉRGIO ARAÚJO

EVIDÊNCIA MOLECULAR PARA A VIA AÉREA DE INFECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE*
E O PAPEL DOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS NA PERSISTÊNCIA DA HANSENÍASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela Maria Bernardes Goulart

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart

UBERLÂNDIA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A663e Araújo, Sérgio, 1983
2016 Evidência molecular para a via aérea de infecção do *Mycobacterium leprae* e o papel dos portadores assintomáticos na persistência da hanseníase / Sérgio Araújo. - 2016.
130 p. : il.

Orientadora: Isabela Maria Bernardes Goulart.

Coorientador: Luiz Ricardo Goulart.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Inclui bibliografia.

1. Ciências Médicas - Teses. 2. Hanseníase - Teses. 3. *Mycobacterium leprae* - Teses. 4. Epidemiologia - Teses. I. Goulart, Isabela Maria Bernardes. II. Goulart, Luiz Ricardo. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

SÉRGIO ARAÚJO

EVIDÊNCIA MOLECULAR PARA A VIA AÉREA DE INFECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE*
E O PAPEL DOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS NA PERSISTÊNCIA DA HANSENÍASE

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Uberlândia, 29 de fevereiro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Isabela Maria Bernardes Goulart (Orientadora)

Examinadores: Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira (UFTM/MG)

Prof^a. Dr^a. Denise von Dolinger de Brito Röder (UFU/MG)

Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade (USP/SP)

Prof^a. Dr^a. Patrícia Sammarco Rosa (ILSL/SP)

As sugestões da comissão examinadora e as normas PGCS para o formato da tese foram contempladas.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Isabela Maria Bernardes Goulart que como orientadora foi uma acompanhante importante nesta jornada de aprendizagem, me auxiliando nas turbulências deste processo árduo, mas gratificante. Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart que como coorientador foi além de um mestre, um amigo.

À minha esposa e companheira Cíntia Aparecida da Silva Araújo que me acompanhou na luta diária em busca deste título. Aos meus filhos Arthur Andrade Araújo e Theo Andrade Araújo por serem meus motivos para vencer os desafios e as maiores conquistas da minha vida.

À minha mãe Julia Ione Vieira Araújo por seu carinho e amor incondicional me amparando durante toda minha vida. Ao meu pai Reny Alan Araújo por sua dedicação e conselhos que me mantiveram na busca pelo conhecimento. Aos meus irmãos Alessandra Araújo e Reny Alan Araújo Júnior que compartilharam alegrias e me ajudaram nos momentos difíceis. A minha avó Emerenciana Ferreira, por seu carinho e amor. Aos meus avós Pedro Araújo e Lídia Gonçalves Araújo (que deus a tenha) por seu exemplo de vida. A todos familiares que sempre me apoiaram.

Aos amigos do grupo de pesquisa, do laboratório, dos trabalhos, dos lugares por onde andei neste longo caminho, por terem compartilhado suas palavras amigas e me emprestado um pouco de suas forças nos momentos que precisei.

Aos membros do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e da Universidade Federal de Uberlândia que me proporcionaram esta possibilidade de expandir meus conhecimentos. A CAPES pelas bolsas de pesquisa no Brasil e nos Estados Unidos durante o Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior. E as outras fontes financiadoras das pesquisas quais estive envolvido: o CNPq, a FAPEMIG e o Ministério da Saúde.

RESUMO

A hanseníase persiste como problema de saúde pública, particularmente no Brasil, segundo país mais endêmico do mundo. Os mecanismos de infecção e a cadeia de transmissão não estão completamente elucidados. Neste estudo investigamos a rota de infecção do *Mycobacterium leprae*, da exposição das vias aéreas, colonização e disseminação pela corrente sanguínea. Este é o primeiro estudo a avaliar no mesmo indivíduo a detecção de DNA de *M. leprae* pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) no vestíbulo nasal, mucosa de conchas nasais, e amostras de sangue periférico; além de sorologia anti-PGL-I por ensaio imunoenzimático de ligação (ELISA), e da resposta de hipersensibilidade tardia pelo teste de Mitsuda. Foram incluídos 113 pacientes com hanseníase e 104 contatos domiciliares de pacientes com hanseníase (HHCs). Resultados foram explorados por estatísticas bivariadas e por análise de correspondência múltipla. Positividade para DNA entre os pacientes foi de: 66,4% (75/113) em swab nasal, 71,7% (81/113) em biópsia de concha nasal, 19,5% (22/113) em amostras de sangue, e soropositividade de 62,8% (71/113); com o aumento de positivities em direção ao polo multibacilar (MB) do espectro clínico. As quantidades médias de *M. leprae* detectado nas diferentes amostras de pacientes foram: 1.8E+07 bacilos/ml em swabs nasais, 4.1E+07 bacilos/ml em biópsias nasais, e 9.3E+03 bacilos/ml em amostras de sangue. Relações estatisticamente significantes foram observadas em todas as comparações pareadas entre os testes, com uma intrincada congruência entre todos os resultados dos pacientes ($P < 0,05$). A positividade entre HHCs foi de: 49% (51/104) para swab nasal, 53,8% (56/104) para biópsias nasais, 6,7% (7/104) para sangue, e 18,3% (19/104) para anti-PGL-I. As quantidades médias de *M. leprae* entre as diferentes amostras foram: 1.8E+04 bacilos/ml em swab nasal, 1.3E+05 bacilos/ml em biópsia nasal, e 1,4E+04 bacilos/ml em sangue. As médias dos índices ELISA dos HHCs de pacientes PB foram menores do que contatos de MB ($P = 0,0037$). A análise de correspondência múltipla dos dados dos HHCs revelou associações entre: os resultados positivos para qPCR no sangue e anti-PGL-I, e resultados positivos para qPCR em swab e biópsia de concha nasal. A comparação entre os valores médios obtidos para os pacientes em relação aos HHCs demonstrou que para ambos locais no nariz (superfície e mucosa), e para sorologia anti-PGL-I, as médias diferiram significativamente ($P < 0,0001$). Durante o período mínimo de seguimento de 5 a 7 anos, de 104 HHCs, 7 desenvolveram hanseníase (6,7%). O risco para o adoecimento foi estimado comparando os resultados de HHCs que desenvolvem doença com aqueles que não foram afetados. Positividade na passagem ou mucosa nasal não foi determinante para desenvolvimento da doença; no entanto, a presença no sangue aumentou o risco [RR / LR + 5,54 (IC 95% 1,30-23,62)], assim como a soropositividade [LR + 3,69 (IC 95% 1,67-8,16); RR 5,97 (IC 95% 1,45-24,5)]. Nossos resultados enfatizam a rota aérea de infecção como predominante. As frequências de positividade entre HHCs revelou que: *M. leprae* está disseminado entre eles; HHCs estão expostos a um grande número de bacilos, independente da manifestação clínica do caso índice; e que, HHCs abrangem um grupo identificável de indivíduos que contribuem para o risco de infecção para eles e, muito provavelmente, para os outros.

Palavras-chave: Hanseníase. Epidemiologia. *Mycobacterium leprae*. PCR em Tempo Real Quantitativa (qPCR). Ensaio de Ligação Imuno-enzimático (ELISA). Glicolípido fenólico I.

ABSTRACT

Leprosy persists as public health problem, particularly in Brazil, the second most endemic country in the world. The chain of transmission and mechanisms of infection are not completely understood. Here we investigated the route of infection and disease onset, from airways exposure, colonization, and bloodstream dissemination. This is the first study to evaluate in the same individual the detection of *M. leprae* DNA through real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in nasal vestibule, nasal turbinate mucosa, and peripheral blood samples; in addition to anti-PGL-I serology by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the delayed hypersensitive response through the Mitsuda test (intra-dermal reaction), of 113 leprosy patients and 104 household contacts of leprosy patients (HHCs). Data exploratory bivariate statistics and multiple correspondence analysis were employed. The DNA positivity among patients: 66.4% (75/113) in nasal swabs, 71.7% (81/113) in nasal turbinate biopsies, 19.5% (22/113) in blood samples, and seropositivity of 62.8% (71/113); with increasing incidences towards the multibacillary (MB) pole of the clinical spectrum. The mean quantities of *M. leprae* detected in the different patient samples were: 1.8E+07 bacilli/reaction in nasal swabs, 4.1E+07 bacilli/reaction in nasal turbinate biopsies, and 9.3E+03 bacilli/reaction in peripheral blood samples. Statistically significant relationships between every pairwise comparison of data and an intricate multivariate congruence were observed for patients' data ($P < 0.05$). The positivity among HHCs: 18.3% (19/104) for anti-PGL-I, 49% (51/104) for nasal swabs, 53.8% (56/104) for nasal biopsies, and 6.7% (7/104) for blood samples. The mean quantities of *M. leprae* among the different samples were: 1.8E+04 bacilli/reaction for nasal swabs, 1.3E+05 bacilli/reaction for nasal turbinate biopsies, and 1.4E+04 bacilli/reaction for peripheral blood samples. The comparison between the mean ELISA indexes obtained for the HHCs of PB patients versus the results from contacts of MB patients were significantly different ($P = 0.0037$). The multiple correspondence analysis of HHCs' data revealed associations between: positive results to both qPCR in blood and anti-PGL-I, and positive results to both qPCR in nasal swab and nasal turbinate biopsies. The comparison between the mean values obtained for patients vs. HHCs, shown that for the both sites in the nose (surface and mucosa), and for the anti-PGL-I, the means differed significantly ($P < 0.0001$). During a minimum follow-up period from 5 to 7 years, out of 104 HHCs, 7 developed leprosy (6.7%). Risk for the disease outcome was estimated comparing results of HHCs WHO develop leprosy with those not affected. Neither nasal passage nor mucosa positivity was determinant of later disease onset; however, blood presence increased the risk for disease development [RR/LR+ 5.54 (IC 95% 1.30 - 23.62)], as well did the seropositivity [LR+ 3.69 (95%CI 1.67 - 8.16); RR 5.97 (95%CI 1.45 - 24.5)]. Our findings strongly suggest that the aerial route of infection and transmission is predominant. The overall frequency of positivity among HHCs revealed that: *M. leprae* is widespread among them; HHCs experience high bacillary burden regardless of their index case disease manifestation; and that, HHCs comprise a recognizable group of individuals that contribute to the infection risk to themselves and most probably to others.

Key words: Leprosy. Epidemiology. *Mycobacterium leprae*. Quantitative Real-Time PCR. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Phenolic glycolipid I.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA.....	10
PATOLOGIA DA HANSENÍASE	12
REAÇÕES HANSÊNICAS.....	13
CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA DA HANSENÍASE	15
TRATAMENTO DA HANSENÍASE	18
IMUNIDADE CELULAR NA HANSENÍASE.....	21
SOROLOGIA NA HANSENÍASE	24
DETECÇÃO DE <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	26
RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA NA HANSENÍASE.....	29
SITUAÇÃO ATUAL.....	35
JUSTIFICATIVA	36
OBJETIVO	37
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II – ARTIGO: ARAUJO ET AL 2016	59
RESUMO	60
INTRODUÇÃO	61
MATERIAL E MÉTODOS	62
RESULTADOS.....	65
DISCUSSÃO	73
REFERÊNCIAS.....	76
CONCLUSÃO	78
APÊNDICE	79
ANEXOS.....	87

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que tem como agente causador o *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) de crescimento lento e um parasita intracelular obrigatório (GOULART et al., 2002). A hanseníase afeta predominantemente a pele, nervos periféricos, e as mucosas (HASTINGS et al., 1988), visto que os principais sítios afetados pela doença são as regiões mais frias do corpo como as extremidades dos membros e da face (HASTINGS et al., 1968), decorrência da temperatura preferencial de crescimento do bacilo ser entre 27 e 30°C (SHEPARD, 1965; SHEPARD e MCRAE, 1965).

O *M. leprae* não é cultivável *in vitro* e os modelos experimentais *in vivo* exigem grande adequação técnica (MADEIRA e ROSA, 2000). No homem, o *M. leprae* é capaz de infectar células do sistema mononuclear fagocitário e apresenta um tropismo singular por células de Schwann produtoras de mielina nos nervos periféricos. O *M. leprae* apresenta alta infectividade, pois é capaz de infectar um grande número de indivíduos (BARRETO et al., 2012), porém possui baixa patogenicidade, uma vez que, apenas uma pequena parte dos indivíduos infectados apresenta sinais clínicos da doença (GOULART e GOULART, 2009). Os sintomas normalmente aparecem após um longo período de incubação que em média varia de 2 a 7 anos, porém este período pode se estender por décadas (LOCKWOOD e REID, 2001).

O diagnóstico da hanseníase é prioritariamente clínico. A Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO, do inglês *World Health Organization*) delinea que a hanseníase seja diagnosticada quando ocorre pelo menos um dos três sinais cardinais da doença: manchas avermelhadas ou hipopigmentadas e/ou áreas com perda de sensibilidade; troncos nervosos espessados com perda de sensibilidade e/ou fraqueza nos músculos enervados por estes; e presença de BAAR em amostra de esfregaço intradérmico (WHO, 2012). Porém estes sinais nem sempre são aparentes e clinicamente a hanseníase se manifesta em um amplo espectro influenciado pela relação individual entre o hospedeiro e o parasita (HASTINGS, 1994).

CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA

A classificação da doença proposta pela OMS e atualmente aceita em todo o mundo, utiliza-se de parâmetros essencialmente operacionais para determinar o tratamento dos doentes. Esta classificação operacional divide os pacientes entre: um grupo com resposta imune celular contra o *M. leprae*, capaz de conter a disseminação da infecção no organismo, apresentando poucos bacilos, portanto denominado paucibacilar (PB); e outro grupo que não possui resposta imune adequada para reprimir a disseminação de bacilos, possibilitando a multiplicação do bacilo pelo organismo, denominado multibacilar (MB).

Considerando esta classificação dos casos de hanseníase, em 1981 a OMS formou o primeiro Grupo de Estudos sobre Quimioterapia da Hanseníase que recomendou os regimes de tratamento para hanseníase PB ou MB uma combinação específica de quimioterápicos (rifampicina, clofazimina e dapsona), denominado poliquimioterapia (PQT ou MDT, do inglês *multi-drug therapy*) (WHO, 1982). Em 1987, na sexta reunião do Comitê de Especialistas em Hanseníase constituído pela OMS (WHO, 1988), foi endossado que todos os casos com identificação da presença de BAAR deveriam ser classificados como hanseníase MB. No ano de 1993, a OMS realizou o segundo Grupo de Estudos sobre Quimioterapia da Hanseníase, qual indicou que onde o exame bacteriológico não fosse disponível, os casos poderiam ser classificados com base no exame clínico, em hanseníase PB (uma a cinco lesões da pele) ou MB (seis ou mais lesões de pele). Quando a forma de classificação estiver duvidosa, recomenda-se que o paciente seja tratado como hanseníase MB.

Atualmente a mais aceita classificação da hanseníase e predominante nas pesquisas científicas foi proposta por Ridley e Jopling em 1962 (RIDLEY e JOPLING, 1962). Este sistema de classificação subdivide os pacientes de acordo com fatores imunológicos, em cinco grupos distintos: tuberculóide (TT), borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB), borderline-lepromatoso (BL), ou lepromatoso (LL) (RIDLEY e JOPLING, 1966). A variedade das formas clínicas é definida por uma vigorosa resposta imune celular no polo tuberculóide e uma progressiva redução na resposta imune celular em direção ao polo lepromatoso,

associada com o aumento na carga bacilar, mais lesões na pele e nos nervos. A classificação da hanseníase borderline compreende as formas clínicas da doença que se manifestam em um espectro contínuo entre os grupos polares TT e LL. Um paciente com hanseníase BB pode desenvolver com o tempo características clínicas, bacteriológicas, e histopatológicas mais semelhantes com a doença tuberculóide (BT), denominado “upgrading”, enquanto o desenvolvimento de características mais semelhantes com a doença lepromatosa (BL) é chamado “downgrading” (HASTINGS, 1994).

No Brasil, a hanseníase consta na lista nacional de doenças de notificação compulsória (SAÚDE, 2011) e todos os casos diagnosticados devem ser cadastrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). O SINAN é um instrumento de coleta e registro de dados da Secretaria de Vigilância à Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS), no qual são cadastradas as informações dos casos de hanseníase diagnosticados em todo o território nacional, pelo preenchimento de uma ficha individual de notificação e investigação para cada paciente (Anexo A). De acordo com a ficha de notificação, o caso de hanseníase deve ser classificado por sua forma clínica e esta considera a classificação de Madri, baseada em uma proposta dos pesquisadores brasileiros Eduardo Rabello e Francisco Acioli Eduardo Rabelo, que foi aceita oficialmente no VI Congresso Internacional de Hanseníase realizado em 1953 na cidade de Madri, na Espanha (ANÔNIMO, 1953). Esta classificação levou em conta dados clínicos e as características de lesões cutâneas apresentadas pelos pacientes, dividindo-os entre as formas: indeterminada (I), tuberculóide (T), dimorfa (D), e virchowiana (V). Consideram-se dois polos estáveis e opostos (T e V), assim como na classificação de Ridley-Jopling (TT e LL), visto que entre estas formas polares são alocados os pacientes instáveis (D), que englobaria os grupos BT, BB e BL da classificação de Ridley-Jopling. Com a evolução natural da doença, o grupo D tende a manifestar características que se assemelham a uma das formas polares definidas. A forma I é considerada uma forma inicial da doença, na qual não se manifestam muitos sinais e sintomas, tão pouco há comprometimento neural grave, podendo esta progredir para uma das formas clínicas no espectro da doença, ou até evoluir para a cura espontânea (OPROMOLLA e URA, 2002).

PATOLOGIA DA HANSENÍASE

A hanseníase indeterminada, considerada a primeira manifestação clínica da hanseníase, é caracterizada pelo aparecimento de manchas hipocrômicas de limites imprecisos e com alteração de sensibilidade, sendo comumente observada alteração sensitiva térmica com preservação tátil e dolorosa. Estas lesões aparecem em qualquer área da pele e podem ser ligeiramente mais secas que a pele normal ao redor. Ainda não há comprometimento de troncos neurais, apenas de ramúsculos nervosos cutâneos (OPROMOLLA e URA, 2002; ARAÚJO, 2003). Apesar de não serem observados bacilos, o exame histopatológico pode revelar a presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário focal, em torno de vasos, anexos, filetes nervosos e apêndices cutâneos (FLEURY, 2000)

A forte resposta imune celular na hanseníase tuberculóide restringe a localização das lesões, que são bem delimitadas e na maioria dos casos se manifesta como lesão única. Observam-se lesões em placas ou anulares, com bordas papulosas e áreas da pele eritematosas ou hipocrômicas. O desenvolvimento centrífugo lento leva à atrofia no interior da lesão, que pode assumir aspecto tricofitóide com descamação das bordas. Ocorre alteração de sensibilidade tátil, térmica e dolorosa, com queda de pelos (alopecia) e diminuição ou ausência de sudorese (anidrose). A forma neural pura também é observada, na qual não há lesões cutâneas, sendo caracterizada pelo espessamento do tronco nervoso com dano neural precoce e grave, principalmente quando atinge nervos sensitivo-motores (OPROMOLLA e URA, 2002; ARAÚJO, 2003). A histopatologia da hanseníase T não apresenta bacilos, são observados granulomas formados por células epitelióides agrupadas compactamente, usualmente em torno de glândulas sudoríparas, vasos e nervos (FLEURY, 2000).

Nas formas instáveis da hanseníase dimorfa são observadas as mais diversas manifestações clínicas, com comprometimento cutâneo, neural e /ou sistêmico. São observadas placas eritematosas, manchas hipocrômicas com bordas ferruginosas, manchas eritematosas ou acastanhadas, com limite interno nítido e limites externos imprecisos, placas eritemato-ferruginosas ou violáceas, com bordas internas nítidas e limites externos difusos (lesões faveolares). A presença de lesões no pescoço e

nuca, infiltração assimétrica da face ou dos pavilhões auriculares são características desta forma clínica (OPROMOLLA e URA, 2002; ARAÚJO, 2003). Podem ser detectados BAAR ou não, sendo que no exame histológico os granulomas de células epitelióides são mais frouxos ou células se encontram espalhadas, linfócitos podem ou não estar presentes e macrófagos podem apresentar aspecto vacuolado. Quando observados bacilos, estes se encontram preferencialmente nos nervos, que podem perder sua estrutura normal (RIDLEY e JOPLING, 1966; FLEURY, 2000).

A manifestação da forma multibacilar polar da hanseníase é identificada pela pouca resistência à proliferação de *M. leprae*, com evolução crônica caracterizada por infiltração cutânea difusa e progressiva, sendo mais acentuada na face e nos membros. Há comprometimento das mucosas das vias aéreas superiores, olhos, testículos, nervos, linfonodos, fígado e /ou baço. Observam-se pápulas, nódulos e máculas. A pele apresenta-se luzidia, xerótica, com aspecto apergaminhado e tonalidade acobreada. Há rarefação de pelos, particularmente nos cílios e supercílios, com ocorrência de queda total de pelos, denominada madarose. Ocorre comprometimento nervoso nos ramúsculos da pele, na inervação vascular e nos troncos nervosos, com deficiências funcionais e seqüelas tardias. A obstrução nasal, rinorréia serossangüinolenta e edema de membros inferiores são sinais precoces da hanseníase virchowiana (OPROMOLLA e URA, 2002; ARAÚJO, 2003). Na histopatologia, são observados múltiplos bacilos íntegros, isolados ou em globias, no interior de macrófagos, filetes nervosos e vasos sanguíneos. Ocorrem agrupamentos de macrófagos, sendo observados também macrófagos com aspecto espumoso, as células de Virchow (RIDLEY e JOPLING, 1966; OPRMOLLA e URA, 2002).

REAÇÕES HANSÊNICAS

Sobrepondo à classificação clínica espectral da hanseníase, impõem-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 já foi 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 e SARNO, 1998) e são classificadas em dois tipos: reação Tipo 1 (reação reversa e reação de “downgrading”) e reação Tipo 2 [reação de exacerbação ou eritema nodoso hansênico (ENH)] (RIDLEY, 1969).

As reações do Tipo 1 ocorrem principalmente em pacientes instáveis (formas BT e BB) com uma potencial defesa imune celular. Na reação reversa há um aumento na imunidade celular com redução no número de bacilos, geralmente como resultado do tratamento, enquanto que na reação de “downgrading” há uma diminuição da imunidade e um aumento correspondente do número de bacilos, ocorrendo geralmente em pacientes ainda não tratados. Clinicamente as duas reações do Tipo 1 são semelhantes, sendo possível diferenciá-las apenas histologicamente, pela capacidade do paciente em produzir, ou não, uma imunidade mediada por células (IMC) contra o *M. leprae* (RIDLEY, 1969).

As reações do Tipo 2 são características da hanseníase polar MB (BL e LL) e podem ocorrer em pacientes tratados ou não. Nestes tipos de reações, ocorre uma exacerbação inflamatória súbita e sistêmica, em muitos casos durante uma recidiva da doença após o tratamento. A manifestação mais frequente da reação Tipo 2 é o ENH, um aparecimento repentino de pápulas, nódulos e placas nodosas de coloração eritematosa, desencadeada pela deposição local de complexos imunes que lesionam o tecido (WEMAMBU et al., 1969).

Associada as reações pode-se observar também a ocorrência de neurite, que também se manifesta de forma silenciosa, com perda sensorial e motora, isto é, o dano funcional do nervo se instala sem quadro clínico de dor e espessamento do nervo, antes, durante ou após alta medicamentosa (LIENHARDT e FINE, 1994)

Os episódios reacionais são considerados uma das principais causas de morbidade e incapacidade na hanseníase, causando danos irreversíveis nos nervos periféricos e resultando na perda da função sensorial e motora, principalmente na face e nos membros, que levam a severas deformidades e ao estigma da doença (LOCKWOOD e SAUNDERSON, 2012).

CONTEXTUALIZAÇÃO HISTÓRICA DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma das mais antigas moléstias que acometeram a humanidade. Apesar de anedóticas, referências a uma doença cutânea e incapacitante, posteriormente traduzida como lepra, estão descritas nas escrituras mais antigas registradas da humanidade, como na bíblia e nos vedas.

Não obstante, nos últimos anos a ciência tem revelado uma relação milenar entre o *M. leprae* e o *Homo sapiens*. O sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* reportado em 2001, com sua peculiar redução genômica evolutiva e pouca variação clonal entre bacilos isolados em todo o mundo (COLE et al., 2001), permitiu que um estudo pioneiro em 2005 demonstrasse associações entre a distribuição geográfica das cepas identificadas globalmente e a migração das primeiras populações humanas infectadas, com provável origem da infecção com *M. leprae* no crescente fértil, presumido também como lugar de origem do homem moderno (MONOT et al., 2005).

A mais antiga evidência patológica da hanseníase em humanos foi relatada em 2009 na revista *Science*, uma das mais prestigiadas no meio científico. Neste estudo foram identificadas características da hanseníase lepromatosa (LL) em um esqueleto humano com sepultamento datado de aproximadamente entre 2500 a 2000 anos antes de Cristo (a.C.), encontrado em um sítio arqueológico na Índia (ROBBINS et al., 2009).

A resistente parede celular do *M. leprae* formada por arranjos complexos de moléculas de carboidratos, lipídios, peptidoglicanos e proteínas, característica do gênero *Mycobacterium*, permite a preservação do DNA destes microrganismos por milênios (HERSHKOVITZ et al., 2008). O registro mais antigo com identificação molecular do DNA de *M. leprae* em material extraído de esqueletos humanos foi descrito em um trabalho publicado em 1994, no qual foram analisados esqueletos com indicações patológicas sugestivas de hanseníase e com sepultamento aproximadamente datado de 600 a.C. ± 50 anos (RAFI et al., 1994).

A primeira descrição do *Mycobacterium leprae* foi atribuída a Gerhard Hinrich Armauer Hansen (1841-1912) (GHOSH e CHAUDHURI, 2015), sobrenome que

posteriormente originaria a nova nomenclatura da doença, deixando de ser chamada lepra e passando a ser denominada hanseníase no Brasil, alteração motivada principalmente pelo estigma histórico ligado à doença. No ano de 1871 durante suas pesquisas no St. Jörgens Hospital em Bergen na Noruega, Hansen observou ao microscópio no interior de células, corpos bacilares que se tingiam pelo ácido ósmico (ROBERTSON, 2003). Estas células haviam sido coletadas de nódulos granulomatosos subcutâneos (hansenomas) de pacientes com hanseníase. Estes tipos de células já haviam sido estudados e descritos pelo mentor de Hansen, Daniel Cornelius Danielssen (1815-1894) e por Wilhelm Boeck (1808-1875), no livro *Traité de la Spédalsked ou éléphantiasis de grecs*, publicado em 1848. Um livro que à luz da microscopia e com ilustrações exemplares, é considerado como o primeiro manuscrito médico “realmente” científico. No entanto, os elementos pardos que Danielssen observara nestas células, foram por ele negligenciados, possivelmente porque tinham sido considerados por Rudolf Ludwig Carl Virchow (1821-1902) como meros artefatos formados por lipídeos degenerados. Virchow foi um patologista com grande prestígio internacional e que naquela época havia sido convidado para colaborar com os estudos de Danielssen sobre hanseníase na Noruega (BECHLER, 2012). Contudo, é interessante constatar que em estudos posteriores, Virchow alteraria sua visão inicial classificando estas células como *leprazellen* (células da lepra em alemão). Estas células comumente observadas em lesões de pacientes MB, atualmente são denominadas células de Virchow e são macrófagos ricos em bacilos e lipídeos que às conferem um aspecto espumoso.

Ao contrário de Danielssen, que acreditava na hereditariedade da hanseníase, Hansen também foi pioneiro ao creditar a etiologia da doença a um microrganismo (HANSEN, 1875), colocando a hanseníase no papel histórico de primeira doença infecciosa com micróbio causador identificado, apesar deste não satisfazer os postulados de Koch (GHOSH e CHAUDHURI, 2015).

No período pré-colonial das Américas, não há evidências da ocorrência de hanseníase entre as tribos indígenas nativas. Devido a este fato, acredita-se que a doença tenha sido introduzida pelos colonizadores europeus e pelo tráfico de escravos africanos. Nos Estados Unidos acredita-se que a hanseníase tenha sido disseminada pelos imigrantes franceses que fundaram a região hoje conhecida

como o estado da Louisiana. Na América latina, os colonizadores espanhóis teriam transmitido a doença aos habitantes nativos. No Brasil, os portugueses seriam os principais carreadores da enfermidade. Independentemente da origem, as precárias condições socioeconômicas daquele período, o completo desconhecimento e a inexistência de terapêuticas eficazes, contribuíram para a propagação da doença (OPROMOLLA e OPRMOLLA, 2000).

No início do século XX no Brasil, pesquisadores brasileiros influenciaram a divulgação do conhecimento sobre a hanseníase e passaram a protagonizar discussões a respeito da doença nas sociedades e jornais médicos internacionais. Discussões sobre a segregação dos indivíduos afetados pela hanseníase estavam em pauta desde 1897, ano da primeira Conferência Internacional sobre Hanseníase, realizada em Berlim (PANDYA, 2004). Quando Oswaldo Cruz assumiu a direção da Diretoria Geral de Saúde Pública do Brasil, estabelecendo uma reforma sanitária promovida pelo Estado, medidas mais rigorosas foram estabelecidas para o controle da hanseníase. Devido às noções médicas da época que consideravam o doente como um risco para aqueles em seu convívio, Oswaldo Cruz propôs em 1913 a construção do primeiro grande leprosário federal na Ilha Grande, distante da costa o suficiente para evitar a evasão dos doentes e o contágio da população sadia (SANTOS, 2007). Este foi o início de uma era marcada pelo preconceito e isolamento daqueles afetados, aumentando e difundindo o medo a respeito da hanseníase e o avassalador estigma psicossociocultural ainda presente na sociedade atual (OLINTO, 2014). A internação compulsória dos pacientes de hanseníase no Brasil foi legalmente abandonada em 1962, no entanto os muitos pacientes que foram afastados de seus vínculos com o mundo exterior, optaram por permanecer nas colônias (CASTRO e WATANABE, 2009).

Em tentativa de diminuir o estigma e preconceito ligado à denominação da doença como lepra, em 1968 o pesquisador brasileiro Abraão Rotberg propôs a mudança da terminologia para hanseníase, mudança que foi aceita no estado de São Paulo em 1970 (ROTBURG, 1969). O Decreto Federal nº 76.078 de 04 de agosto de 1975 alterou em território nacional a denominação oficial da doença para hanseníase (OPROMOLLA e MARTELLI, 2005).

TRATAMENTO DA HANSENÍASE

Antes do surgimento dos antibióticos modernos o óleo de chaulmoogra era usualmente aplicado para o tratamento da hanseníase. O óleo faz parte dos medicamentos utilizados na medicina ayurvédica para o tratamento de diversas doenças da pele. O pesquisador britânico Frederic John Mouat é considerado como quem introduziu o uso do óleo no ocidente, utilizando-o em 1854 como um agente tópico e oral no tratamento de casos de hanseníase (PARASCANDOLA, 2003). A administração tópica apresentava poucos efeitos e a ingestão gerava náusea e desconfortos intestinais. Apesar destas dificuldades, em 1916 no hospital-colônia para pacientes de hanseníase na cidade de Carville, na Louisiana (EUA), o médico Ralph Hopkins realizou um estudo com pacientes que ali residiam, porém os resultados foram decepcionantes com menos de 30% de melhoras (8% pioraram e a taxa de mortalidade foi de 4%) (PARASCANDOLA, 2003; SANTOS et al., 2008).

Em 1908 os pesquisadores alemães Emil Fromm e Jakob Wittmann foram os primeiros a sintetizar o composto 4-[(4-aminobenzeno)sulfonil]anilina, também conhecido como dapsona, porém estavam em busca de um corante azoico e suas pesquisas não exploraram o efeito antibiótico. Foi apenas três décadas depois, em 1937, que Buttle na Inglaterra e Fournau na França, reportaram simultaneamente a potencialidade do uso da dapsona como um efetivo antibiótico (WOZEL, 1989). Investigações posteriores propiciaram sintetizar os compostos do grupo das sulfas, utilizados para o controle de diversas infecções.

Na hanseníase, as sulfonas foram pioneiramente testadas no hospital-colônia de Carville a partir de 1941, pelo médico norte americano Guy Henry Faget (1891-1947) e sua equipe (FAGET et al., 1943). Na forma do cloridrato “Promin” o medicamento apresentou um efeito terapêutico inigualável no tratamento da hanseníase e esse sucesso passou a ser conhecido mundialmente como “o milagre de Carville” (PARASCANDOLA, 1998).

No Brasil a sulfona foi utilizada pela primeira vez em 1944, no asilo-colônia Padre Bento em Guarulhos, SP (OPROMOLLA, 1997). A dapsona ainda é utilizada até hoje no tratamento PQT da hanseníase.

A partir da década de 60, relatos sobre resistência medicamentosa à sulfonas na hanseníase passaram a surgir e a gradativamente por em perigo o milagroso tratamento da doença (FLOCH, 1957; REES, 1964; ADAMS e WATERS, 1966; REES, 1967; BROWNE, 1969). Enquanto os casos de resistência à monoterapia aumentavam na década seguinte, diversas novas drogas eram testadas (ANÔNIMO, 1971; SHEPARD et al., 1971). A falta de critérios científicos e de técnicas experimentais dificultava este processo, porém entre os novos compostos dois quimioterápicos se destacaram: a clofazimina (LEVY et al., 1972; AZULAY et al., 1974; RODRIGUEZ et al., 1974; TOLENTINO et al., 1974; TAYLOR e ALEXANDER, 1976) e a rifampicina (REES et al., 1970; HOLMES e HILSON, 1972; LANGUILLON, 1975; REES et al., 1976). O aumento exponencial de casos resistentes ao redor do mundo com relatos de casos com resistência primária a dapsona (PEARSON et al., 1977; GIRDHAR et al., 1978; GUINTO et al., 1981), juntamente com indícios da existência de *M. leprae* resistente à rifampicina (JACOBSON e HASTINGS, 1976; PATTYN et al., 1976), exigiam uma medida de contenção rápida e eficaz para esta endemia que afetava dezenas de milhares de pessoas no início da década de 80. Em 1982 a OMS instituiu o tratamento da hanseníase pela PQT (WHO, 1982).

Durante décadas seguintes, novas drogas pertencentes às famílias das fluoroquinolonas, ciclinas e macrolídeos foram identificadas como eficazes contra o *M. leprae* (GROSSET, 2001). Em modelos animais ou em humanos, a minociclina, a ofloxacina e a claritromicina, demonstraram individualmente ou em combinação, atividade contra o *M. leprae* superior ao das drogas dapsona e clofazimina (JI et al., 1991; JI et al., 1993; GELBER et al., 1995; JI et al., 1996). Nos seres humanos, uma dose única da combinação ofloxacina (400mg) mais minociclina (100mg) foi capaz de matar 68% a 98% de *M. leprae* viáveis. Além disso, uma única dose de ROM, uma combinação de três drogas [rifampicina (600mg), ofloxacina (400mg) e minociclina (100mg)], foi capaz de matar 99% dos bacilos viáveis (JI et al., 1998). Como resultado de ensaio clínico randomizado (MANE et al., 1997), o sétimo relatório do Comitê de Especialistas em Hanseníase da OMS em 1997, recomendou o uso de uma dose única de ROM para o tratamento de pacientes PB com lesão única (WHO, 1998). Em 2011 uma revisão sistemática concluiu que uma única dose ROM é inferior à PQT no tratamento de pacientes PB, porém não existem evidências

sobre múltiplas doses ROM e este regime deveria ser comparado à PQT em ensaios randomizados (SETIA et al., 2011).

O Ministério da Saúde brasileiro em cumprimento às recomendações da OMS regulamenta o tratamento ambulatorial da hanseníase por meio de esquemas terapêuticos padronizados de acordo com a classificação operacional do paciente. Os casos PB devem ser tratados com regime de 6 doses: rifampicina (600mg) com administração supervisionada mensal e dapsona (100mg mensal e dose diária autoadministrada de 100mg). Na sexta dose, os pacientes PB devem ser submetidos ao exame dermatológico, avaliação neurológica, do grau de incapacidade física e receber alta por cura. Os casos MB devem ser tratados com regime de 12 doses: rifampicina (600mg), dapsona (100mg) e clofazimina (300mg) com administração supervisionada mensal, e dose diária com dapsona (100mg) e clofazimina (50mg) autoadministrada. Na décima segunda dose, os pacientes MB devem ser submetidos ao exame dermatológico, avaliação neurológica, do grau de incapacidade física e receber alta por cura. Pacientes MB que não apresentarem melhora clínica ao final do tratamento devem ser encaminhados para avaliação nas unidades de maior complexidade para verificar a necessidade de um segundo ciclo de tratamento com 12 doses. Em crianças ou adultos com peso inferior a 30 kg deve-se ajustar a dose de acordo com o peso. Em casos de intolerância ou contraindicação esquemas terapêuticos substitutivos com a combinação de ofloxacina e/ou minociclina são recomendados (BRASIL, 2010).

Na última década, duas novas drogas promissoras para o tratamento da hanseníase possibilitam pela primeira vez a combinação de fármacos verdadeiramente bactericidas na PQT, uma vez que, dapsona e clofazimina são considerados apenas bacteriostáticos para o *M. leprae*. Ambos compostos, a moxifloxacina (uma fluoroquinolona) (PARDILLO et al., 2008; PARDILLO et al., 2009) e a bedaquilina (diarilquinolina R207910 ou TCM207) (FRANZBLAU, 2005; JI et al., 2006; GELBER et al., 2009), têm demonstrado atividade similar à rifampicina, eliminando mais de 90% dos bacilos com apenas uma dose. Estudos clínicos randomizados deveriam ser realizados para comprovar a eficácia superior de novos regimes comparados ao tratamento atual.

IMUNIDADE CELULAR NA HANSENÍASE

Embora a hanseníase seja uma doença infecciosa crônica ela também pode ser considerada uma doença imunológica. A resposta imune individual frente ao *M. leprae* irá determinar a supressão ou o estabelecimento da doença, e quando esta ocorrer, qual manifestação clínica o indivíduo irá apresentar.

O processo imunológico a nível celular está intimamente relacionado aos padrões de citocinas produzidas pelas primeiras células de defesa, à quantidade produzida, ao período de produção e à disponibilidade destas citocinas no sítio da infecção (YAMAMURA, 1992; GOULART et al., 2002; KABELITZ e MEDZHITOV, 2007). Quando a micobactéria entra em contato com os macrófagos do hospedeiro, ele é fagocitado e o macrófago passa a produzir citocinas IL-1, TNF- α e IL-12 que atuam sobre linfócitos T, principalmente CD4+ tornando-os ativados e capazes de produzir suas próprias citocinas. Os linfócitos CD4+ são subdivididos em Th1, que produzem as citocinas IL-2, IFN- γ e TNF β , e em Th2 que produzem as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10 (SAMPAIO e SARNO, 1998; GOULART et al., 2002; MONTOYA et al., 2009; MODLIN, 2010).

Na hanseníase, a ativação dos linfócitos T-auxiliares 1 (Th1) produz IL-2 e leva à proliferação de elementos da IMC e da hipersensibilidade tardia. Por meio de fatores como o IFN- γ , os linfócitos Th1 ativam os macrófagos aumentando suas capacidades microbicidas. Além disso, um excesso de IFN- γ pode suprimir a função dos linfócitos Th2 (OTTENHOFF et al., 2005). No entanto, a citocina IL-4, produzida por linfócitos Th2, suprime a ativação das células Th1 ao mesmo tempo em que promove diferenciação e ativação de células B (GOULART et al., 2000; GOULART et al., 2002; MODLIN, 2010).

Pacientes com hanseníase TT têm uma forte imunidade celular, mas apresentam baixa produção de anticorpos. Esse modelo de imunidade é refletido em granulomas que se formam em torno dos nervos e produzem dano neural sensorial periférico e lesões de pele secundárias (DE FREITAS e SAID, 2013). Nesses pacientes, observa-se uma resposta imune celular específica com participação de linfócitos, principalmente do tipo TCD4+, típico do padrão Th1. Desse modo, *M.*

leprae é raramente visto e a resistência ao patógeno é forte, a julgar pela ativação *in vitro* de linfócitos de pacientes em respostas aos antígenos de *M. leprae* (MODLIN e REA, 1988). As citocinas que predominam nas lesões da forma clínica TT são típicas do padrão Th1 (IL-2 e IFN- γ) e atuam no sentido de aumentar a IMC (MODLIN, 2010).

Pacientes com hanseníase LL não apresentam significativa resposta celular ao *M. leprae* e nas lesões de pele encontram-se macrófagos jovens pouco diferenciados e um pequeno número de células T, predominantemente do tipo CD8+ (GOULART et al., 1996). Nesse polo, predomina a imunidade humoral tipo Th2, a qual exibe altos títulos de anticorpos específicos contra o glicolípido fenólico I (PGL-I), antígeno específico de *M. leprae*, presente nos tecidos e soro de pacientes BL e LL, sem, no entanto, conferir proteção efetiva contra o bacilo (SPENCER e BRENNAN, 2011). A elevada titulação da citocina TGF β associada à presença do PGL-I desempenha uma ação supressora da imunidade celular em lesões hanseníacas na derme e secretada sistemicamente induz efeitos pró-inflamatórios, atuando como moduladora nas reações inflamatórias agudas de ENH, sendo também associada à resposta imune Th2 em formas MB de hanseníase (GOULART et al., 2000).

Até pouco tempo, as células T CD4+ eram caracterizadas em um modelo bifásico de diferenciação nos subtipos Th1 ou Th2, dependendo das citocinas que produziam. Porém recentemente diversas subpopulações de células T também envolvidas com a resposta imune foram descritas e caracterizadas, e atualmente os subtipos de células T são distinguidos não só pelas citocinas, mas também pela expressão de fatores de transcrição, incluindo os subtipos Th17, Th9, T-auxiliar folicular (Tfh) e as células T-reguladoras (Treg) (HIRAHARA e NAKAYAMA, 2016).

Células TCD4+CD25+Foxp3+ com antígenos e funções características são descritas como células Treg, pois suprimem ativamente a resposta imune a antígenos próprios e antígenos tumorais e inibem o desenvolvimento de doenças autoimunes, assim como controlam a resposta inflamatória a bactérias, vírus, parasitas e fungos, contribuindo para a persistência do agente infeccioso (KAUFMANN e KABELITZ, 2010). Pesquisas têm demonstrado um predomínio de

células Treg, especialmente produtoras de IL-10 (Th3), nas formas do polo lepromatoso da doença, indicando um papel supressor da resposta imune (PALERMO et al., 2012; FERNANDES et al., 2013) e eventual persistência da infecção pelo *M. leprae* (KUMAR et al., 2013; BOBOSHA et al., 2014).

Os Linfócitos Th17, secretores da citocina IL-17 que têm ação pró-inflamatória, estão envolvidos na defesa contra microrganismos e na mediação de inflamação (KAUFMANN e KABELITZ, 2010). Na hanseníase, a resposta Th17 foi descrita como relacionada à imunopatogenia da reação Tipo 2 (MARTINIUK et al., 2012) e relacionada a forma LL (SAINI et al., 2013).

Diante da complexidade dos mecanismos da resposta imune, torna-se difícil determinar as causas da anergia celular em pacientes LL, a qual pode ser resultante de defeitos no processamento e apresentação do antígeno aos linfócitos T, ou então devido à ausência de linfócitos reativos ao *M. leprae*. Nas lesões de pacientes LL há predomínio de linfócitos T supressores ao contrário do que ocorre na forma TT, na qual predomina os linfócitos T auxiliares. Além disso, pode haver deficiência na produção de citocinas estimuladoras e reguladoras (GORODEZKY et al., 2004; SADHU et al., 2016).

A capacidade individual de gerar uma resposta imune celular específica contra o *M. leprae* pode ser mensurada pelo teste de Mitsuda, uma ferramenta importante no prognóstico dos casos de hanseníase que foi introduzida oficialmente no VI Congresso Internacional de Hanseníase de 1953 em Madri (ANÔNIMO, 1953). Este é um teste intradérmico, no qual é injetada uma suspensão de bacilos mortos que desencadeia no local uma reação de hipersensibilidade tardia do tipo granulomatosa. O resultado é obtido após 21 a 28 dias e é graduado de acordo com a medida em milímetros (mm) do diâmetro da endureção (não do eritema) no local da injeção. Em geral são considerados positivos resultados maiores ou iguais (\geq) a 5 mm. Pacientes MB, especialmente aqueles com formas clínicas BL e LL, apresentam deficiência no combate ao *M. leprae* e conseqüentemente seus resultados são negativos no teste de Mitsuda. Do outro lado, pacientes PB, particularmente TT, são reativos ao teste e apresentam resultados positivos. Em pacientes borderline, verifica-se que a positividade da reação diminui gradualmente

a partir do polo TT, à medida que a resposta imune celular diminui em direção ao polo LL (DHARMENDRA e LOEW, 2012). Em indivíduos saudáveis a positividade ao teste de Mitsuda é associada a uma menor probabilidade de este desenvolver a doença posteriormente (GOULART et al., 2008).

SOROLOGIA NA HANSENÍASE

No início dos anos 80, o grupo do pesquisador Patrick Brennan, da Universidade Estadual do Colorado (EUA), descreveu o PGL-I, uma molécula predominante na parede celular do *M. leprae* e altamente antigênica, principalmente na estimulação da produção de imunoglobulina do tipo M (IgM) (HUNTER e BRENNAN, 1981; HUNTER et al., 1982; CHO et al., 1983). Esta molécula da parede celular não é apenas antigênica, mas também está envolvida no processo patogênico da invasão de células de Schwann (NG et al., 2000) e na regulação negativa da resposta imune inflamatória, o que permite a persistência de *M. leprae* no organismo (SPENCER e BRENNAN, 2011).

O potencial do PGL-I ser utilizado na sorologia da hanseníase tem sido testado e comprovado até os dias atuais. A soropositividade anti-PGL-I em indivíduos com hanseníase MB é alta, visto que a titulação dos anticorpos é diretamente proporcional à carga bacilar (CHO et al., 2001). Contudo, em pacientes PB, com raros bacilos, a sorologia anti-PGL-I tem utilidade limitada (LOBATO et al., 2011a; SPENCER e BRENNAN, 2011). O mesmo grupo que descreveu o PGL-I nativo, apresentou posteriormente a síntese da porção antigênica sacarídea do PGL-I, os compostos: dissacarídeo natural-octil (ND-O) e trissacarídeo natural-fenol (NT-P), com potencial utilização na sorologia (FUJIWARA et al., 1984).

Os testes sorológicos anti-PGL-I são capazes de detectar anticorpos não só entre os pacientes de hanseníase e muitos estudos relatam a detecção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* em população sadia e em contatos domiciliares de pacientes com hanseníase (MENZEL et al., 1987; DESFORGES et al., 1989; ILANGUMARAN et al., 1996). Esta positividade indica que estas pessoas foram expostas ao bacilo, e que este conseguiu infectar uma célula fagocítica e

posteriormente elicitar uma resposta imune humoral com produção de anticorpos pelos linfócitos B, caracterizando assim, em um indivíduo assintomático, uma infecção subclínica (LOBATO et al., 2011a).

Vários grupos utilizaram procedimentos pós-genômicos para descobrir novos antígenos com potencial para utilização no diagnóstico sorológico da hanseníase (SPENCER et al., 2005; ARÁOZ et al., 2006; REECE et al., 2006; DUTHIE et al., 2007; GELUK et al., 2011). Estes estudos têm explorado sequências específicas do DNA de *M. leprae* para a identificação de proteínas ou peptídeos que possam ser adequados ao sorodiagnóstico dos diferentes estágios e formas clínicas da hanseníase. No entanto, a identificação de antígenos específicos do *M. leprae* é uma tarefa complexa, devido a poucas informações sobre a função de proteínas expressas ou sobre o estágio metabólico do microrganismo durante a infecção e progressão da doença (AKAMA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2009).

Recentemente, um teste sorológico quantitativo rápido para a detecção de infecção por *M. leprae* foi desenvolvido com base na detecção de anticorpos IgM contra o ND-O (PGL-I sintético) e anticorpos IgG contra a proteína LID-1 (proteína quimérica formada pela fusão de duas proteínas identificadas pelo grupo do *Infectious Diseases Research Institute*) (DUTHIE et al., 2014a). A combinação destes dois antígenos (NDO-LID) em um único teste foi reportada como uma potencial ferramenta para ser utilizada como um alerta para o exame físico ou para o acompanhamento dos indivíduos positivos a fim de permitir o diagnóstico precoce (QIONG-HUA et al., 2013), também como um teste de diagnóstico para a hanseníase MB (DUTHIE et al., 2014b). No entanto, não se sabe ao certo as vantagens destes antígenos em relação ao PGL-I e estudos prospectivos de longa duração devem ser realizados para esclarecer estas premissões.

Testes sorológicos utilizados em pesquisas de investigação populacional, os chamados *screenings*, podem ser importantes ferramentas para auxiliar no diagnóstico precoce de novos casos, principalmente dos pacientes com hanseníase MB (GOULART e GOULART, 2009). A detecção de anticorpos específicos contra o PGL-I apresenta positividade de 13% a 25% no grupo dos contatos de pacientes com hanseníase, além de estudos já terem demonstrado uma associação entre a

soropositividade anti-PGL-I em contatos e um risco maior de adoecer (GOULART et al., 2008; MOURA et al., 2008).

Ainda hoje, o maior desafio no desenvolvimento de um teste sorológico para o diagnóstico específico da hanseníase é a identificação de antígenos que diferenciem entre a exposição e a doença; e naqueles indivíduos soropositivos, diferencie com alta sensibilidade e especificidade o estágio e a forma clínica da doença.

DETECÇÃO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

O *M.leprae* é um microrganismo do reino Monera, filo e classe Actinobacteria, ordem *Actinomicetales*, família *Mycobacteriaceae* composta pelo único gênero *Mycobacterium*. Observado em microscopia, o *M. leprae* é um bacilo em forma de bastonete, reto ou levemente encurvado com extremidades arredondadas, apresentando aproximadamente 1 a 8 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de diâmetro. Possui divisão binária muito lenta, é Gram-positivo e um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR).

Na técnica de coloração de Ziehl-Neelsen para microscopia, 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 lipídeos estruturais na parede celular, que provoca uma grande hidrofobicidade, dificultando a ação dos mordentes e diferenciadores de corantes aquosos (SHEPARD e MCRAE, 1968). Algumas modificações na técnica de Ziehl-Neelsen, como realização do procedimento a frio e o método Fite-Faraco, podem auxiliar na obtenção de um melhor resultado.

O exame de baciloscopia ainda é considerado o padrão ouro de diagnóstico laboratorial em hanseníase e o resultado é importante para identificar os pacientes com maior carga bacilar e com maior risco de recidivas. O exame de baciloscopia e a obtenção do índice baciloscópico (IB) procedem da coleta de esfregaço intradérmico dos dois lóbulos auriculares, dos dois cotovelos, dos dois joelhos e de áreas infiltradas ou lesões.

Após a realização de procedimentos laboratoriais de coloração da lâmina e observação em microscopia ótica com imersão à óleo, 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 10.000 bacilos por grama de tecido para detecção confiável (SHEPARD e MCRAE, 1968), a sensibilidade é baixa, principalmente em pacientes com hanseníase PB, na qual os bacilos são raros ou indetectáveis.

Uma das grandes limitações no estudo da hanseníase sempre foi a incapacidade do cultivo de *M. leprae* em meio de cultura artificial. Em 1960, Charles Shepard (1914-1985) obteve êxito ao demonstrar que era possível sustentar uma infecção localizada com multiplicação limitada de *M. leprae* em coxim plantar de camundongos (Swiss Webster CFW) infectados com bacilos obtidos de biópsias de pacientes com hanseníase. Dependendo da quantidade inoculada, em geral era possível obter multiplicação em períodos de 9 a 12 meses, também era possível realizar a passagem das cepas para novos camundongos (SHEPARD, 1960b).

Em busca de modelos animais para pesquisa na hanseníase, na década de 1970, o grupo norte americano do laboratório do NHDP (do inglês *National Hansen's Disease Programs*), localizado dentro da área do hospital-colônia de Carville na Louisiana, realizou experimentações com o tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) e observaram que este animal não apresentava defesa contra o *M. leprae*, possibilitando uma infecção disseminada com comprometimento dos nervos periféricos, linfonodos, baço e fígado. A susceptibilidade natural do tatu permitiu a obtenção de grandes quantidades de, *M. leprae*, visto que, de um grama de tecido do baço ou fígado de um animal infectado era possível obter 10^{10} bacilos (KIRCHHEIMER e STORRS, 1971; KIRCHHEIMER et al., 1972; STORRS et al., 1974; BINFORD et al., 1976). Este mesmo grupo de pesquisa foi o primeiro a reportar em 1977 a ocorrência da infecção natural em tatus (MEYERS et al., 1977). Os tatus são atualmente considerados como um importante modelo animal para a hanseníase, porem não são adequados para a manutenção e propagação de cepas isoladas de *M. leprae*, usualmente mantidas em camundongos.

A obtenção de *M. leprae* em grande quantidade e de fontes não humanas abriu novas perspectivas para o estudo deste microrganismo tão incompreendido. Durante os anos 80, a descrição e os estudos de moléculas específicas, assim como o surgimento de novas tecnologias, impulsionou as pesquisas sobre o agente causador da hanseníase. No final da década de 80, três trabalhos demonstraram a possibilidade do uso da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) para detecção específica do DNA de *M. leprae* (HARTSKEERL et al., 1989; WOODS e COLE, 1989; WILLIAMS et al., 1990).

A PCR é uma técnica relativamente rápida, específica e sensível, que permite a amplificação e identificação do DNA de *M. leprae* em amostras contendo pequenas quantidades de bacilos, potencializando a uso de ferramentas moleculares laboratoriais não só na pesquisa, mas também para auxiliar no diagnóstico de hanseníase, na classificação dos pacientes e no monitoramento do tratamento com a PQT (GOULART et al., 2007). A PCR tornou-se uma técnica com múltiplas aplicações e passível de utilização em amostras coletadas das mais diversas fontes, abrindo assim uma gama imensa de novas possibilidades para investigar sobre os diversos aspectos da hanseníase. A partir da PCR foi possível o sequenciamento do genoma completo do *M. leprae* (COLE et al., 2001), a identificação dos poucos genótipos do bacilo (TRUMAN et al., 2004) e da provável origem da infecção em humanos (MONOT et al., 2005), assim como diversas outras descobertas de não seriam possíveis sem uma técnica mais precisa e menos trabalhosa do que a baciloscopia.

O desenvolvimento da técnica de PCR em tempo-real quantitativa (qPCR) melhorou a sensibilidade e a especificidade na detecção do DNA de *M. leprae*. Um estudo particular que descreveu um técnica de qPCR para detecção do gene repetitivo RLEP do genoma de *M. leprae*, por meio da amplificação e hibridização de sonda específica, indicou a potencial detecção de aproximadamente 10 bacilos em uma amostra, com quantificação da carga bacteriana pela interpolação com o número de moléculas de DNA de um controle padrão conhecido (TRUMAN et al., 2008).

RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA NA HANSENÍASE

Desde sua introdução, qualquer quimioterapia com antibióticos está sujeita ao desenvolvimento de resistência medicamentosa, que pode ser devido a uma ampla variedade de mecanismos bioquímicos e fisiológicos. É crucial para a prevenção e controle efetivo das doenças infecciosas que a resistência aos antibióticos seja monitorada para compreender este mecanismo molecular. As mutações genéticas em determinadas regiões genômicas necessárias para a atividade antimicrobiana de fármacos em patógenos bacterianos, as chamadas regiões determinantes de resistência às drogas (RDRDs), são um dos principais elementos funcionais na redução da atividade antibiótica (DAVIES e DAVIES, 2010).

A determinação do genoma (COLE et al., 2001) e a pouca variabilidade genética (MONOT et al., 2009) proporcionaram possibilidades de explorar o mecanismo molecular da resistência aos medicamentos neste bacilo clinicamente e socialmente importante. Mutações em RDRDs têm sido identificadas dentro dos genes *rpoB*, *folP1* e *gyrA*, associadas com a resistência à rifampicina, dapsona e ofloxacina, respectivamente. Casos de resistência a outras drogas alternativas utilizadas no tratamento da hanseníase, tais como, a minociclina e clofazimina, ainda não foram relatados (MATSUOKA, 2010).

A rifampicina é um dos únicos medicamentos a ser consistentemente bactericida contra o *M. leprae*. Ela tem como alvo a subunidade beta (β) da polimerase de RNA codificada pelo gene *rpoB*, e quando se liga a esta molécula inibe a transcrição do RNA mensageiro dependente de DNA. Mutações em RDRDs nos códons 407, 410, 420, 425 ou 427 do gene *rpoB* foram identificadas em cepas resistentes à rifampicina (MATSUOKA, 2010; WILLIAMS e GILLIS, 2012).

O atual tratamento PQT da hanseníase foi parcialmente definido para minimizar o desenvolvimento de cepas resistentes a dapsona, inicialmente recomendada como monoterapia. Ela tem como alvo a diidropteroato sintetase (DHPS), codificada pelo gene *folP1*, e inibe a síntese do ácido fólico por competição com o ácido para-aminobenzóico (PABA). Isolados resistentes à dapsona têm

demonstrado mutações *missense* em RDRDs nos códons 53 e 55 do gene *folP1* (MATSUOKA, 2010; WILLIAMS et al., 2014).

A ofloxacina é uma droga substitutiva no tratamento da hanseníase. Ela se liga as subunidades da DNA girase e inibe a replicação do DNA. Mutações RDRDs dentro desta região altamente conservada (codificada pelos genes *gyrA* e possivelmente *gyrB*), têm sido associadas com resistência à ofloxacina em *M. leprae* (CAMBAU et al., 2002; YOKOYAMA et al., 2012; VEZIRIS et al., 2013).

Ao longo dos últimos anos, cepas de *M. leprae* resistentes a um ou mais antibióticos na PQT, têm sido crescentemente relatadas em todo o mundo. Do mesmo modo, tem sido observado um aumento do número de casos de recidiva de hanseníase, atingindo no Brasil 4% dos casos novos registrados em 2014 (SINAN), que, juntamente com os casos de falência terapêutica poderiam agir na seleção de cepas com mutações associadas à resistência medicamentosa (SINGH e COLE, 2011). Em combinação com o surgimento da hanseníase multidroga resistente primária (WILLIAMS et al., 2013), este conjunto de circunstâncias podem comprometer as medidas de controle existentes.

A inoculação em pata de camundongo e o teste de suscetibilidade neste modelo ainda são definitivos para determinar a resistência do *M. leprae*, no entanto, o fato de alguns isolados de *M. leprae* não se multiplicarem e de muitos meses serem necessários para atingir o crescimento satisfatório das cepas que sobrevivem; dificultam a aplicação prática desta metodologia. Desta forma, o sequenciamento do DNA (produto da PCR com alvo as RDRDs) foi a metodologia proposta pela OMS para a vigilância global da resistência medicamentosa em hanseníase a ser desenvolvida em laboratórios de referência (WHO, 2009). Embora concebível, o sequenciamento de DNA não está disponível para a vigilância da resistência medicamentosa como rotina nas comunidades mais endêmicas, ou não é eficiente em termos de custo para ser aplicável para pesquisas de grande porte com muitas amostras. A técnica emergente da análise da dissociação em alta resolução (HRM, do inglês: *High Resolution Melting*) evita os procedimentos de sequenciamento do DNA subsequente à PCR em tempo real com resultados promissores para as aplicações clínicas e em campo (LI et al., 2011).

TRANSMISSÃO DA HANSENÍASE

Os mecanismos de infecção e da transmissão da hanseníase não estão completamente elucidados. A transmissão da hanseníase ainda é ativa e ocorre apesar do acesso global ao tratamento eficaz com a PQT; o fator primário associado à cura e a principal estratégia no controle da doença.

Os indivíduos portadores de hanseníase sem tratamento, especialmente aqueles com manifestação MB, são geralmente considerados como a principal fonte de transmissão. No entanto, após trinta anos de uma campanha global para eliminação da doença, novos casos são detectados em grandes proporções nas regiões endêmicas (BARRETO et al., 2012) e em lugares não tão endêmicos, casos são diagnosticados entre pessoas que relatam não terem contato anterior com pacientes (ABIDE et al., 2008; MARCOS et al., 2015). Estas observações indicam que deve haver outras fontes de infecção não reveladas (MATSUOKA et al., 1999; LAVANIA et al., 2006; LAHIRI e KRAHENBUHL, 2008; TRUMAN et al., 2011; SHARMA et al., 2015; MOHANTY et al., 2016)

O modo de transmissão da hanseníase é ainda um assunto amplamente discutido na comunidade científica atual. O trato respiratório superior tem sido considerado por muito tempo como um importante portal de entrada e saída de bacilos de *M. leprae* (SHEPARD, 1960a; 1962; DAVEY e REES, 1974; REES e MCDOUGALL, 1977; GREEN et al., 1983), principalmente depois de estudos em meados dos anos 70 terem demonstrado as similaridades com o modo de transmissão da tuberculose (REES e MEADE, 1974) e a infecção aérea experimental em camundongos (REES e MCDOUGALL, 1977). Entretanto, diversas teorias ainda refutam esta proposta (BRANDSMA et al., 2008). A pele também é considerada entre uma das principais portas de entrada e saída de *M. leprae* (PEDLEY, 1977; KOTTEESWARAN et al., 1980; GIRDHAR, 2005; JOB et al., 2008; GHORPADE, 2011). As evidências da derme como porta de entrada em grande maioria são relatos de casos de lesões hansênicas em lugares onde ocorreu um trauma ou inoculação acidental (GHORPADE, 2002; ACHILLES et al., 2004; BRANDSMA et al., 2005; GHORPADE, 2009a; b) e também de estudos epidemiológicos que demonstram que na maioria dos casos com apenas uma lesão,

estas se localizam em áreas expostas do corpo (HORTON e POVEY, 1966; ABRAHAM et al., 1998). Como local de saída, a pele de pacientes LL apresenta um grande número de bacilos em todas suas camadas, inclusive na camada queratinosa (SATAPATHY et al., 2005; JOB et al., 2008), porém esta é uma característica de pacientes LL, que não é uma forma clínica prevalente, e a emergência de bacilos da epiderme intacta é improvável (PEDLEY, 1970).

Muitas hipóteses foram propostas sobre as possíveis fontes de infecção não identificadas a partir das quais o *M. leprae*, e conseqüentemente a hanseníase, poderia ser transmitido. Entre estas potenciais fontes de transmissão incluem: o ambiente (solo e água) (DESIKAN, 1977; BLAKE et al., 1987; DESIKAN e SREEVATSA, 1995; MATSUOKA et al., 1999; VAEREWIJCK et al., 2005; LAVANIA et al., 2006; TURANKAR et al., 2012; MOHANTY et al., 2015; 2016), insetos vetores (incluindo o *Aedes aegypti*) (GEATER, 1975; KIRCHHEIMER, 1976; NARAYANAN et al., 1977; NARAYANAN et al., 1978; BANERJEE et al., 1991; SREEVATSA et al., 1992; SREEVATSA, 1993), amebas de vida livre (LAHIRI e KRAHENBUHL, 2008; DRANCOURT, 2014; WHEAT et al., 2014), primatas (HAGSTAD, 1983; GORMUS et al., 1988; HAMILTON et al., 2008; ISHII et al., 2011), o tatu (JOB et al., 1986; WALSH et al., 1988; TRUMAN, 2005; 2008; TRUMAN et al., 2011; BALAMAYOORAN et al., 2015; SHARMA et al., 2015); e até mesmo que os bacilos poderiam ser transmitidos, por transmissão vertical ou amamentação (GIRDHAR et al., 1981; MELSOM et al., 1982; DUNCAN et al., 1983; BRUBAKER et al., 1985), e por transplante de órgãos (MODI et al., 2003; LAUNIUS et al., 2004; SHIH et al., 2005; GASINK et al., 2006; GUDITI et al., 2009; ARDALAN et al., 2011; TRINDADE et al., 2011). Cada uma dessas preposições traz uma contribuição importante para a nossa compreensão atual da cadeia de transmissão da hanseníase.

Considerando as vias aéreas, o nariz demonstra uma importância irrefutável na etiopatogenia da hanseníase. O papel central do nariz na patologia foi demonstrado e ilustrado por fotomicrografias em uma publicação do médico brasileiro Humberto Cerrutti na Revista Brasileira de Leprologia em 1944. Neste estudo, em apenas 14 das 116 biópsias da mucosa nasal avaliadas foram observadas características normais deste tecido celular (CERRUTI, 1944). Um estudo da década de 90 demonstrou também que mesmo na hanseníase neural

pura, metade dos pacientes apresentaram alterações inflamatórias na mucosa nasal (SUNEETHA et al., 1998).

Uma grande questão na transmissão da hanseníase continua sendo porque apenas alguns indivíduos desenvolvem a hanseníase e outros não. A descoberta do bacilo não foi suficiente para derrubar a ideia da hereditariedade. Ainda em 1937 Rotberg defendeu a existência de um componente genético na susceptibilidade natural à doença denominado fator-N. Após o advento da PCR muitos estudos descreveram ligações entre genes específicos, como NRAMP1, PARK2 e HLA-DR (RANI et al., 1993; BLACKWELL et al., 1997; SOEBONO et al., 1997; ROY et al., 1999; MEISNER et al., 2001; FERREIRA et al., 2004; MIRA et al., 2004; SHANKARKUMAR, 2004; MALHOTRA et al., 2006), e mesmo com pesquisas recentes utilizando modernas tecnologias como o sequenciamento genômico completo das amostras (*genome-wide association studies*) (ZHANG et al., 2009; NETEA et al., 2010; WONG et al., 2010), a principal evidência generalizada que ainda prevalece na pesquisa sobre hanseníase é que esta é uma doença multigênica e multifatorial.

Vários estudos demonstram uma ampla disseminação de *M. leprae* em regiões endêmicas e que o contato com um paciente de hanseníase está associado com o aumento do risco para desenvolver a doença (GANAPATI et al., 1986; PONNIGHAUS e FINE, 1988; NAIK et al., 1989; RAJAGOPALAN et al., 1989; ULRICH et al., 1991; FINE et al., 1997; BAKKER et al., 2004; DOUGLAS et al., 2004; MOET et al., 2004; BAKKER et al., 2006; MOET et al., 2006; GOULART et al., 2008; SALES et al., 2011), o que é coerente, uma vez que este indivíduo recebeu uma exposição contínua, seja proveniente do caso índice antes do início do tratamento ou da mesma fonte de infecção do paciente. Por outro lado, a maioria dos indivíduos expostos ao bacilo não manifestam doença, o que indica que o contato com um caso de hanseníase não é necessário para transmissão (RICHARDUS et al., 2005) e que provavelmente existe um estágio de infecção subclínica e/ou assintomática pelo *M. leprae* (GODAL e NEGASSI, 1973; IZUMI, 1999). Entre os principais marcadores utilizados para indicar uma infecção subclínica pelo *M. leprae* estão os testes sorológicos (ABE et al., 1980; ABE et al., 1981; STONER et al., 1981; JI et al., 1984; BHARADWAJ e KATOCH, 1989; ABE et

al., 1990; KAMPIRAPAP, 2008; LOBATO et al., 2011b; BARRETO et al., 2012). O principal antígeno com resultados consistentes em diversos estudos ainda é o PGL-I nativo e a mais bem definida metodologia para a sorologia é o ensaio imunoenzimático de ligação (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*).

É possível que a defesa contra o *M. leprae* seja dependente da resposta imune gerada na porta de entrada do bacilo no organismo (SHEPARD et al., 1982). Considerando a inoculação intradérmica como imunogênica (exemplo a reação ao teste de Mitsuda), a entrada do bacilo por um ferimento na pele iria ativar uma resposta linfocitária celular e predisporia a uma manifestação da hanseníase PB. Em contraposição, o contato prolongado via inalação, poderia favorecer uma resposta humoral e levar a uma tolerância ao *M. leprae* (RIDLEY, 1988). A imunidade nas mucosas também pode ser um fator diferencial na proteção ou colonização do tecido nasal, uma vez que já foi demonstrado que trabalhadores de um hospital que lidavam com pacientes de hanseníase apresentavam IgA secretora anti-*M. leprae*, enquanto que pacientes LL não as produziam em quantidades detectáveis (CREE et al., 1988). É interessante ressaltar que diversos estudos em diferentes regiões demonstraram a presença de DNA de *M. leprae* na passagem nasal de contatos de pacientes e em populações saudáveis de áreas endêmicas, independente do desenvolvimento de doença posteriormente (PATTYN et al., 1993; VAN BEERS et al., 1994; HATTA et al., 1995; RAMAPRASAD et al., 1997; IZUMI et al., 1999; BEYENE et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004; PATROCINIO et al., 2005; JOB et al., 2008).

SITUAÇÃO ATUAL

Eventos marcantes no controle da hanseníase como a introdução da PQT na década de 80 (WHO, 1982) e a resolução da 44^a Assembleia Mundial da Saúde de 1991 para a eliminação da hanseníase (reduzir a prevalência abaixo de 1 caso por 10.000) como um problema de saúde pública (WHO, 1991), contribuíram para promover o acesso global ao tratamento e notável redução da prevalência nas últimas décadas.

O último relatório publicado pela WHO reportou que a prevalência mundial de hanseníase registrada no primeiro trimestre de 2015 foi de 175.554 casos (WHO, 2015). No entanto, a detecção de 213.899 casos novos de hanseníase durante o ano de 2014, indica que a infecção está ativa, principalmente nas regiões do Sudeste-asiático, África e América Latina. O segundo país mais afetado pela hanseníase no mundo continua sendo o Brasil, com 31.064 casos novos reportados em 2014, o que representa 92% dos casos novos relatados em toda a região das Américas durante o mesmo ano (WHO, 2015).

As atuais estratégias para conter a transmissão estão direcionadas para a busca ativa de casos e vigilância epidemiológica de contatos. É provável que uma ação que abordasse novas metodologias e intervenções baseadas em recentes evidências científicas, possa resultar em uma melhor eficiência no controle da hanseníase e propiciar a definição de novas políticas públicas para eliminação da hanseníase.

O uso da epidemiologia molecular para compreender melhor a interação hospedeiro-parasita em nível individual e populacional é promissor. A viabilidade e aplicabilidade de estudos epidemiológicos incorporando dados de biologia molecular dependem de técnicas que muitas vezes não permitem a inclusão de um número grande de indivíduos e para dar consistência aos resultados é fundamental que as pesquisas sejam conduzidas em diferentes condições e em grupos diferentes de população.

JUSTIFICATIVA

Os programas de controle de doenças infecciosas devem se basear em quatro principais estratégias: prevenção, diagnóstico, tratamento e interrupção da cadeia de transmissão.

Apesar da preconização da imunização com a BCG e de esforços conjuntos de diversos grupos de pesquisa para o desenvolvimento de uma nova vacina comprovadamente eficaz contra a hanseníase, ainda não existe uma prevenção primária à hanseníase. Em um trabalho recente nosso grupo de pesquisa demonstrou que não só a BCG tem efeito protetor para a hanseníase, mas seu reforço aumenta exponencialmente essa proteção. Este mesmo estudo demonstrou que o teste de Mitsuda positivo também indica proteção, e também demonstrou que uma combinação destes testes com a sorologia anti-PGL-I pode auxiliar na definição do risco em adoecer (ARAUJO et al., 2015) (Anexo B).

Novas metodologias moleculares mais específicas, sensíveis e reprodutíveis do que a microscopia ótica para BAAR podem auxiliar no diagnóstico precoce e correto da hanseníase. Em pesquisas anteriores o nosso grupo de pesquisa demonstrou que pessoas saudáveis (Anexo C) (GOULART et al., 2015) e os contatos domiciliares (Anexo D) (REIS et al., 2014) de pacientes de hanseníase que apresentaram resultados positivos para a sorologia anti-PGL-I e para a PCR para detecção do DNA de *M. leprae* tiveram um risco muito maior para desenvolver a hanseníase posteriormente, quando comparados com os indivíduos com resultados negativos.

Devido à emergência de resistência medicamentosa às drogas da PQT, é essencial a vigilância da resistência medicamentosa. Além de aderir aos protocolos propostos pela OMS, nosso grupo de pesquisa em parceria com o NHDP (EUA) propuseram avaliar a aplicabilidade de novas metodologias que possibilitam a identificação das cepas resistentes de uma forma mais rápida, prática e com menor custo para que possa ser aplicada em áreas endêmicas (Anexo E).

OBJETIVO

A fim de obter evidências da via aérea de infecção e transmissão do *M. leprae*, foi proposto utilizar testes moleculares com marcadores específicos para o *M. leprae* para investigar a rota de infecção de *M. leprae*, partindo da superfície do epitélio nasal, colonização do tecido da mucosa e disseminação pela corrente sanguínea, em amostras de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária/Hanseníase do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (CREDESH/HCU/UFU).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Utilizar a qPCR para detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal, biópsia de concha nasal e de sangue periférico coletadas do mesmo indivíduo, sendo estes, pacientes com hanseníase virgens de tratamento e contatos domiciliares de pacientes de hanseníase.
- 2- Associar a qPCR em amostras de esfregaço intradérmico e biópsia de pele do diagnóstico dos pacientes com os testes propostos para investigar a via de infecção.
- 3- Aplicar ensaios sorológicos específicos para o *M. leprae* em amostras de soro coletadas de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares de pacientes de hanseníase.
- 4- Avaliar associações entre os resultados obtidos nos grupos e entre os grupos avaliados.
- 5- Avaliar associações entre os resultados obtidos nos grupos e entre os grupos avaliados.

Aspectos Éticos

Projeto submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos na UFU (Anexo F). Participantes foram orientados sobre a pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo G).

REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 48, n. 2, p. 109-19, Jun 1980.
- ABE, M. et al. Subclinical infection in leprosy--its detection and control by fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test. **Lepr Rev**, v. 52 Suppl 1, p. 263-73, Dec 1981.
- _____. Immuno-epidemiological studies on subclinical infection in leprosy. I. Clinical and immunological findings in schoolchildren and adults in Okinawa. **Nihon Rai Gakkai Zasshi**, v. 59, n. 2, p. 130-44, Apr-Jun 1990.
- ABIDE, J. M. et al. Three indigenous cases of leprosy in the Mississippi delta. **South Med J**, v. 101, n. 6, p. 635-8, Jun 2008.
- ABRAHAM, S. et al. Epidemiological significance of first skin lesion in leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 66, n. 2, p. 131-9, Jun 1998.
- ACHILLES, E. G. et al. Leprosy accidentally transmitted from a patient to a surgeon in a nonendemic area. **Ann Intern Med**, v. 141, n. 3, p. W51, Aug 3 2004.
- ADAMS, A. R.; WATERS, M. F. Dapsone-resistant lepromatous leprosy in England. **Br Med J**, v. 2, n. 5518, p. 872, Oct 8 1966.
- AKAMA, T. et al. Whole-genome tiling array analysis of *Mycobacterium leprae* RNA reveals high expression of pseudogenes and noncoding regions. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3321-3327, 2009.
- ALMEIDA, E. C. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5, p. 509-11, Aug 2004.
- ANÔNIMO. [Propositions of a group of leprologists of Madrid regarding the classification of leprosy]. *Actas Dermosifiliogr*, 1953. Jun. p.706-8.
- _____. Antileprosy drugs. **Br Med J**, v. 3, n. 5767, p. 174-6, Jul 17 1971.
- ARÁOZ, R. et al. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 1, p. 175-182, 2006.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 373-382, 2003.
- ARAUJO, S. et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guerin 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. 739-45, Dec 2015.

- ARDALAN, M. et al. Lepromatous leprosy in a kidney transplant recipient: a case report. **Exp Clin Transplant**, v. 9, n. 3, p. 203-206, 2011.
- AZULAY, R. D. et al. The antileprotic action of clofazimine (B663, G30, 320, Lamprene). **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 42, n. 1, p. 13-8, Jan-Mar 1974.
- BAKKER, M. I. et al. Population survey to determine risk factors for Mycobacterium leprae transmission and infection. **Int J Epidemiol**, v. 33, n. 6, p. 1329-36, Dec 2004.
- BAKKER, M. I. et al. Risk factors for developing leprosy--a population-based cohort study in Indonesia. **Lepr Rev**, v. 77, n. 1, p. 48-61, Mar 2006.
- BALAMAYOORAN, G. et al. The armadillo as an animal model and reservoir host for Mycobacterium leprae. **Clin Dermatol**, v. 33, n. 1, p. 108-15, Jan-Feb 2015.
- BANERJEE, R. et al. Transmission of viable Mycobacterium leprae by Aedes aegypti from lepromatous leprosy patients to the skin of mice through interrupted feeding. **Lepr Rev**, v. 62, n. 1, p. 21-6, Mar 1991.
- BARRETO, J. G. et al. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl 1, p. 60-7, Dec 2012.
- BECHLER, R. G. Hansen versus Neisser: controvérsias científicas na 'descoberta' do bacilo da lepra. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 19, p. 815-842, 2012.
- BEYENE, D. et al. Nasal carriage of Mycobacterium leprae DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. **Epidemiol Infect**, v. 131, n. 2, p. 841-8, Oct 2003.
- BHARADWAJ, V. P.; KATOCH, K. Detection of subclinical infection in leprosy: an 8 years follow-up study. **Indian J Lepr**, v. 61, n. 4, p. 495-502, Oct 1989.
- BINFORD, C. H.; STORRS, E. E.; WALSH, G. P. Disseminated infection in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) resulting from inoculation with *M. leprae*. Observations made on 15 animals studied at autopsy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 44, n. 1-2, p. 80-3, Jan-Jun 1976.
- BLACKWELL, J. M. et al. Immunogenetics of leishmanial and mycobacterial infections: the Belem Family Study. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 352, n. 1359, p. 1331-45, Sep 29 1997.
- BLAKE, L. A. et al. Environmental nonhuman sources of leprosy. **Rev Infect Dis**, v. 9, n. 3, p. 562-77, May-Jun 1987.
- BOBOSHA, K. et al. T-cell regulation in lepromatous leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 4, p. e2773, 2014.
- BRANDSMA, J. W. et al. Mycobacterial infections causing cutaneous disease; or how is leprosy transmitted? **Lepr Rev**, v. 79, n. 2, p. 196-8, Jun 2008.

BRANDSMA, J. W.; YODER, L.; MACDONALD, M. Leprosy acquired by inoculation from a knee injury. **Lepr Rev**, v. 76, n. 2, p. 175-9, Jun 2005.

BRASIL. **Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase.** SAÚDE, M. D.: Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil 2010.

BROWNE, S. G. Dapsone-resistant Mycobacterium leprae in a patient receiving dapsone in low doses. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 37, n. 3, p. 296-301, Jul-Sep 1969.

BRUBAKER, M. L.; MEYERS, W. M.; BOURLAND, J. Leprosy in children one year of age and under. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 53, n. 4, p. 517-23, Dec 1985.

CAMBAU, E. et al. Molecular detection of rifampin and ofloxacin resistance for patients who experience relapse of multibacillary leprosy. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 1, p. 39-45, Jan 1 2002.

CASTRO, S. M. S. D.; WATANABE, H. A. W. Isolamento compulsório de portadores de hanseníase: memória de idosos. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 16, p. 449-487, 2009.

CERRUTI, H. Histopathology of the Nasal Mucosa in Leprosy. **Revista brasileira de leprologia**, v. 12, n. 4, p. 309-364, 1944.

CHO, S.-N. et al. Detection of Phenolic Glycolipid I of Mycobacterium leprae in Sera from Leprosy Patients before and after Start of Multidrug Therapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 1, p. 138-142, 2001.

CHO, S. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from Mycobacterium leprae and use in serodiagnosis of leprosy. **Infection and immunity**, v. 41, n. 3, p. 1077-1083, 1983.

COLE, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007-1011, 2001.

CREE, I. A. et al. Mucosal immunity to mycobacteria in leprosy patients and their contacts. **Lepr Rev**, v. 59, n. 4, p. 309-16, Dec 1988.

DAVEY, T. F.; REES, R. J. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. **Lepr Rev**, v. 45, n. 2, p. 121-34, Jun 1974.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE FREITAS, M. R.; SAID, G. Leprous neuropathy. **Handb Clin Neurol**, v. 115, p. 499-514, 2013.

DESFORGES, S. et al. 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, Dec 1989.

DESIKAN, K. V. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. **Lepr Rev**, v. 48, n. 4, p. 231-5, Dec 1977.

DESIKAN, K. V.; SREEVATSA. Extended studies on the viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. **Lepr Rev**, v. 66, n. 4, p. 287-95, Dec 1995.

DHARMENDRA; LOEW, J. The immunological skin tests in leprosy. Part II. The isolated protein antigen in relation to the classical Mitsuda reaction and the early reaction to lepromin. 1942. **Indian J Med Res**, v. 136, n. 3, p. 9p following 502, Sep 2012.

DOUGLAS, J. T. et al. 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, Sep 2004.

DRANCOURT, M. Looking in amoebae as a source of mycobacteria. **Microb Pathog**, v. 77, p. 119-24, Dec 2014.

DUNCAN, M. E. et al. A clinical and immunological study of four babies of mothers with lepromatous leprosy, two of whom developed leprosy in infancy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 51, n. 1, p. 7-17, Mar 1983.

DUTHIE, M. S. et al. Rapid Quantitative Serological Test for Detection of Infection with *Mycobacterium leprae*, the Causative Agent of Leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 613-9, Feb 2014a.

DUTHIE, M. S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400-1408, 2007.

DUTHIE, M. S. et al. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 79, n. 2, p. 233-9, Jun 2014b.

FAGET, G. H. et al. **The promin treatment of leprosy: a progress report.** publisher not identified, 1943.

FERNANDES, C. et al. Increased frequency of CD4 and CD8 regulatory T cells in individuals under 15 years with multibacillary leprosy. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79072, 2013.

FERREIRA, F. R. et al. Susceptibility to leprosy may be conditioned by an interaction between the NRAMPI promoter polymorphisms and the lepromin response. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 72, n. 4, p. 457-67, Dec 2004.

FINE, P. E. et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **Am J Epidemiol**, v. 146, n. 1, p. 91-102, Jul 1 1997.

FLEURY, R. Patologia e manifestações viscerais. **Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato**, p. 63-71, 2000.

FLOCH, H. [Sulfone-resistance of Hansen's bacillus]. **Publ Inst Pasteur Guyane Fr Inini**, v. 18, n. 429, p. 1-9, Jul 1957.

FRANZBLAU, S. A potentially new treatment for tuberculosis; will a diarylquinoline work for leprosy? **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 73, n. 1, p. 32, Mar 2005.

FUJIWARA, T. et al. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. **Infect Immun**, v. 43, n. 1, p. 245-52, Jan 1984.

GANAPATI, R.; REVANKAR, R. R.; NAIK, S. S. Risk of exposure to leprosy in hyperendemic slums of Bombay. **Lepr Rev**, v. 57, n. 3, p. 275, Sep 1986.

GASINK, L. B. et al. An uncommon presentation of an uncommon disease: leprosy in a heart transplant recipient. **The Journal of heart and lung transplantation**, v. 25, n. 7, p. 854-856, 2006.

GEATER, J. G. The fly as potential vector in the transmission of leprosy. **Lepr Rev**, v. 46, n. 4, p. 279-86, Dec 1975.

GELBER, R. et al. The diarylquinoline R207910 is bactericidal against *Mycobacterium leprae* in mice at low dose and administered intermittently. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 9, p. 3989-91, Sep 2009.

GELBER, R. H. et al. Activity of Combinations of Dapsone, Rifampin, Minocycline, Clarithromycin, and Sparfloxacin Against *M. leprae*-Infected Mice. **International journal of leprosy and other mycobacterial diseases**, v. 63, p. 259-259, 1995.

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Leprosy review**, v. 82, n. 4, p. 402, 2011.

GHORPADE, A. Inoculation (tattoo) leprosy: a report of 31 cases. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, n. 5, p. 494-499, 2002.

GHORPADE, A. Ornamental tattoos and skin lesions. Tattoo inoculation borderline tuberculoid leprosy. **Int J Dermatol**, v. 48, n. 1, p. 11-3, Jan 2009a.

_____. Post-traumatic inoculation tuberculoid leprosy after injury with a glass bangle. **Lepr Rev**, v. 80, n. 2, p. 215-8, Jun 2009b.

GHORPADE, A. K. Transepidermal elimination of *Mycobacterium leprae* in histoid leprosy: a case report suggesting possible participation of skin in leprosy transmission. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 77, n. 1, p. 59-61, Jan-Feb 2011.

GHOSH, S.; CHAUDHURI, S. Chronicles of Gerhard-Henrik Armauer Hansen's Life and Work. **Indian J Dermatol**, v. 60, n. 3, p. 219-21, May-Jun 2015.

GIRDHAR, A. et al. Discharge of *M. leprae* in milk of leprosy patients. **Lepr India**, v. 53, n. 3, p. 390-4, Jul 1981.

GIRDHAR, B. K. Skin to skin transmission of leprosy. **Indian J Dermatol Venereol Lepr**, v. 71, n. 4, p. 223-5, Jul-Aug 2005.

GIRDHAR, B. K.; SREEVATSA; DESIKAN, K. V. Primary sulphone resistance. A preliminary report. **Lepr India**, v. 50, n. 3, p. 352-5, Jul 1978.

GODAL, T.; NEGASSI, K. Subclinical infection in leprosy. **Br Med J**, v. 3, n. 5880, p. 557-9, Sep 15 1973.

GORMUS, B. J. et al. A second sooty mangabey monkey with naturally acquired leprosy: first reported possible monkey-to-monkey transmission. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 56, n. 1, p. 61-5, Mar 1988.

GORODEZKY, C. et al. Molecular mechanisms of MHC linked susceptibility in leprosy: towards the development of synthetic vaccines. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 84, n. 1-2, p. 82-92, 2004.

GOULART, I. M. et al. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 10, p. 3345-8, Oct 2015.

GOULART, I. M. et al. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 1, p. 101-5, Jan 2008.

GOULART, I. M. et al. 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. 5-6, p. 267-71, Aug 2007.

GOULART, I. M. et al. Detection of transforming growth factor-beta 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **Am J Pathol**, v. 148, n. 3, p. 911-7, Mar 1996.

GOULART, I. M.; MINEO, J. R.; FOSS, N. T. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clin Exp Immunol**, v. 122, n. 3, p. 330-4, Dec 2000.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 4, p. 365-75, Jul-Aug 2002.

GOULART, L. R.; GOULART, I. M. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Arch Dermatol Res**, v. 301, n. 2, p. 123-37, Feb 2009.

- GREEN, C. A.; KATOCH, V. M.; DESIKAN, K. V. Quantitative estimation of *Mycobacterium leprae* in exhaled nasal breath. **Lepr Rev**, v. 54, n. 4, p. 337-40, Dec 1983.
- GROSSET, J. H. Newer drugs in leprosy. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 69, n. 2, p. S14, 2001.
- GUDITI, S. et al. Leprosy in a renal transplant recipient: review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, v. 11, n. 6, p. 557-562, 2009.
- GUINTO, R. S. et al. Primary dapsone-resistant leprosy in Cebu, Philippines. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 49, n. 4, p. 427-30, Dec 1981.
- HAGSTAD, H. V. Leprosy in sub-human primates: potential risk for transfer of *Mycobacterium leprae* to humans. **Lepr Rev**, v. 54, n. 4, p. 353-6, Dec 1983.
- HAMILTON, H. K. et al. The role of the armadillo and sooty mangabey monkey in human leprosy. **Int J Dermatol**, v. 47, n. 6, p. 545-50, Jun 2008.
- HANSEN, G. A. **On the etiology of leprosy**. J. & A. Churchill, 1875.
- HARTSKEERL, R. A.; DE WIT, M. Y.; KLATSER, P. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J Gen Microbiol**, v. 135, n. 9, p. 2357-64, Sep 1989.
- HASTINGS, R. **Leprosy 2nd edn. Singapore: Churchill Livingstone: Longman** 1994.
- HASTINGS, R. C. et al. Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related to temperature. **Lepr Rev**, v. 39, n. 2, p. 71-4, Apr 1968.
- HASTINGS, R. C. et al. Leprosy. **Clin Microbiol Rev**, v. 1, n. 3, p. 330-48, Jul 1988.
- HATTA, M. et al. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, n. 4, p. 381-5, Jul-Aug 1995.
- HERSHKOVITZ, I. et al. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. **PLoS ONE**, v. 3, n. 10, p. e3426, 2008.
- HIRAHARA, K.; NAKAYAMA, T. CD4+ T cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. **Int Immunol**, Feb 12 2016.
- HOLMES, I. B.; HILSON, G. R. The effect of rifampicin and dapsone on experimental *Mycobacterium leprae* infections: minimum inhibitory concentrations and bactericidal action. **J Med Microbiol**, v. 5, n. 2, p. 251-61, May 1972.
- HORTON, R. J.; POVEY, S. The distribution of first lesions in leprosy. **Lepr Rev**, v. 37, n. 2, p. 113-4, Apr 1966.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **Journal of bacteriology**, v. 147, n. 3, p. 728-735, 1981.

HUNTER, S. W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 24, p. 15072-15078, 1982.

ILANGUMARAN, S. et al. Immunological profiles of leprosy patients and healthy family contacts toward *M. leprae* antigens. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 64, n. 1, p. 6-14, Mar 1996.

ISHII, N. et al. [Leprosy in a chimpanzee]. **Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi**, v. 80, n. 1, p. 29-36, Feb 2011.

IZUMI, S. Subclinical infection by *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 67, n. 4 Suppl, p. S67-71, Dec 1999.

IZUMI, S. et al. An epidemiological study on *Mycobacterium leprae* infection and prevalence of leprosy in endemic villages by molecular biological technique. **Indian J Lepr**, v. 71, n. 1, p. 37-43, Jan-Mar 1999.

JACOBSON, R. R.; HASTINGS, R. C. Rifampin-resistant leprosy. **Lancet**, v. 2, n. 7998, p. 1304-5, Dec 11 1976.

JI, B. et al. Bactericidal activities of R207910 and other newer antimicrobial agents against *Mycobacterium leprae* in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1558-60, Apr 2006.

JI, B. et al. Powerful bactericidal activities of clarithromycin and minocycline against *Mycobacterium leprae* in lepromatous leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 1, p. 188-190, 1993.

JI, B. et al. Bactericidal activity of single dose of clarithromycin plus minocycline, with or without ofloxacin, against *Mycobacterium leprae* in patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2137-2141, 1996.

JI, B.; PERANI, E. G.; GROSSET, J. H. Effectiveness of clarithromycin and minocycline alone and in combination against experimental *Mycobacterium leprae* infection in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 3, p. 579-581, 1991.

JI, B. et al. Bactericidal Activity of a Single-Dose Combination of Ofloxacin plus Minocycline, with or without Rifampin, against *Mycobacterium leprae* in Mice and in Lepromatous Patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1115-1120, 1998.

JI, B. H. et al. The sensitivity and specificity of fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. **Lepr Rev**, v. 55, n. 4, p. 327-35, Dec 1984.

JOB, C. K. et al. Thorns in armadillo ears and noses and their role in the transmission of leprosy. **Arch Pathol Lab Med**, v. 110, n. 11, p. 1025-8, Nov 1986.

JOB, C. K. et al. 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. 518-21, Mar 2008.

KABELITZ, D.; MEDZHITOV, R. Innate immunity--cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 1, p. 1-3, Feb 2007.

KAMPIRAPAP, K. Assessment of subclinical leprosy infection through the measurement of PGL-1 antibody levels in residents of a former leprosy colony in Thailand. **Lepr Rev**, v. 79, n. 3, p. 315-9, Sep 2008.

KAUFMANN, S. H.; KABELITZ, D. **Immunology of Infection**. Academic Press, 2010.

KIRCHHEIMER, W. F. The role of arthropods in the transmission of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 44, n. 1-2, p. 104-7, Jan-Jun 1976.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 39, n. 3, p. 693-702, Jul-Sep 1971.

KIRCHHEIMER, W. F.; STORRS, E. E.; BINFORD, C. H. Attempts to establish the Armadillo (*Dasyus novemcinctus* linn.) as a model for the study of leprosy. II. Histopathologic and bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the Armadillo. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 40, n. 3, p. 229-42, Jul-Sep 1972.

KOTTEESWARAN, G.; CHACKO, C. J.; JOB, C. K. Skin adnexa in leprosy and their role in the dissemination of *M. leprae*. **Lepr India**, v. 52, n. 4, p. 475-81, Oct 1980.

KUMAR, S. 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.

LAHIRI, R.; KRAHENBUHL, J. L. The role of free-living pathogenic amoeba in the transmission of leprosy: a proof of principle. **Lepr Rev**, v. 79, n. 4, p. 401-9, Dec 2008.

LANGUILLON, J. Treatment of leprosy with clofazimine, rifampicin and Bayrena. **Lepr Rev**, v. 46, n. 2 Suppl, p. 81-4, Jun 1975.

LAUNIUS, B. K. et al. A case study in Hansen's disease acquired after heart transplant. **Critical care nursing quarterly**, v. 27, n. 1, p. 87-91, 2004.

LAVANIA, M. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from soil samples by PCR targeting RLEP sequences. **J Commun Dis**, v. 38, n. 3, p. 269-73, Mar 2006.

LEVY, L.; SHEPARD, C. C.; FASAL, P. Clofazimine therapy of lepromatous leprosy caused by dapsone-resistant mycobacterium leprae. **Am J Trop Med Hyg**, v. 21, n. 3, p. 315-21, May 1972.

LI, W. et al. Real-time PCR and high resolution melt analysis for rapid detection of Mycobacterium leprae drug resistance mutations and strain types. **Journal of clinical microbiology**, p. JCM. 05183-11, 2011.

LIENHARDT, C.; FINE, P. E. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? **Lepr Rev**, v. 65, n. 1, p. 9-33, Mar 1994.

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

LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 389-401, Dec 2011b.

LOCKWOOD, D. N.; SAUNDERSON, P. R. Nerve damage in leprosy: a continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. **International health**, v. 4, n. 2, p. 77-85, 2012.

LOCKWOOD, D. N. J.; REID, A. J. C. The diagnosis of leprosy is delayed in the United Kingdom. **QJM**, v. 94, n. 4, p. 207-212, 2001-04-01 00:00:00 2001.

MADEIRA, S.; ROSA, P. S. Hanseníase experimental. **Noções de Hansenologia**, v. 2, 2000.

MALHOTRA, D. et al. Association study of major risk single nucleotide polymorphisms in the common regulatory region of PARK2 and PACRG genes with leprosy in an Indian population. **Eur J Hum Genet**, v. 14, n. 4, p. 438-42, Apr 2006.

MANE, I.; CARTEL, J. L.; GROSSET, J.-H. Field Trial on Efficacy of Supervised Monthly Dose of 600 mg Ritampin, 400 mg Ofloxacin and 100 mg Minocycline for the Treatment of Leprosy; First Results. 1997.

MARCOS, L. A. et al. Indigenous Cases of Leprosy (Hansen's Disease) in Southern Mississippi. **J Miss State Med Assoc**, v. 56, n. 7, p. 188-91, Jul 2015.

MARTINIUK, F. et al. Lessons of leprosy: the emergence of TH17 cytokines during type II reactions (ENL) is teaching us about T-cell plasticity. **J Drugs Dermatol**, v. 11, n. 5, p. 626-30, May 2012.

MATSUOKA, M. Drug resistance in leprosy. **Jpn J Infect Dis**, v. 63, n. 1, p. 1-7, Jan 2010.

MATSUOKA, M. et al. Mycobacterium leprae DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection. **Indian J Lepr**, v. 71, n. 1, p. 61-7, Jan-Mar 1999.

MEISNER, S. J. et al. Association of NRAMP1 polymorphism with leprosy type but not susceptibility to leprosy per se in west Africans. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 6, p. 733-5, Dec 2001.

- MELSOM, R.; HARBOE, M.; DUNCAN, M. E. IgA, IgM and IgG anti-M. leprae antibodies in babies of leprosy mothers during the first 2 years of life. **Clin Exp Immunol**, v. 49, n. 3, p. 532-42, Sep 1982.
- MENZEL, S. et al. Antibodies to a synthetic analog of phenolic glycolipid-I of Mycobacterium leprae in healthy household contacts of patients with leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 55, n. 4, p. 617-25, Dec 1987.
- MEYERS, W. M. et al. Naturally acquired leprosy-like disease in the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): reactions in leprosy patients to lepromins prepared from naturally infected armadillos. **J Reticuloendothel Soc**, v. 22, n. 4, p. 369-75, Oct 1977.
- MIRA, M. T. et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. **Nature**, v. 427, n. 6975, p. 636-40, Feb 12 2004.
- MODI, K.; MANCINI, M.; JOYCE, M. P. Lepromatous leprosy in a heart transplant recipient. **American Journal of Transplantation**, v. 3, n. 12, p. 1600-1603, 2003.
- MODLIN, R. L. The innate immune response in leprosy. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 1, p. 48-54, Feb 2010.
- MODLIN, R. L.; REA, T. H. Immunopathology of leprosy granulomas. **Springer Semin Immunopathol**, v. 10, n. 4, p. 359-74, 1988.
- MOET, F. J. et al. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. **Lepr Rev**, v. 75, n. 4, p. 310-26, Dec 2004.
- MOET, F. J. 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, n. 3, p. 346-53, Feb 1 2006.
- MOHANTY, P. S. et al. Viability of Mycobacterium leprae in the environment and its role in leprosy dissemination. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, Nov 3 2015.
- _____. Viability of Mycobacterium leprae in the environment and its role in leprosy dissemination. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 82, n. 1, p. 23-7, Jan-Feb 2016.
- MONOT, M. et al. On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040-1042, May 13, 2005 2005.
- MONOT, M. et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of Mycobacterium leprae. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1282-9, Dec 2009.
- MONTOYA, D. et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. **Cell Host Microbe**, v. 6, n. 4, p. 343-53, Oct 22 2009.
- MOURA, R. S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41 Suppl 2, p. 11-8, 2008.

- NAAFS, B. Leprosy reactions. New knowledge. **Tropical and geographical medicine**, v. 46, n. 2, p. 80, 1994.
- NAIK, S. S. et al. Identification of "high risk group" of leprosy in children using serological and lepromin test: a preliminary report. **Indian J Lepr**, v. 61, n. 2, p. 173-5, Apr 1989.
- NARAYANAN, E. et al. Transfer of leprosy bacilli from patients to mouse footpads by *Aedes aegypti*. **Lepr India**, v. 49, n. 2, p. 181-6, Apr 1977.
- NARAYANAN, E. et al. Persistence and distribution of *Mycobacterium leprae* in *Aedes aegypti* and *Culex fatigans* experimentally fed on leprosy patients. **Lepr India**, v. 50, n. 1, p. 26-37, Jan 1978.
- NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W. Genomewide association study of leprosy. **N Engl J Med**, v. 362, n. 15, p. 1447; author reply 1447-8, Apr 15 2010.
- NG, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 511-24, Oct 27 2000.
- OLINTO, B. A. Lepra, medicina e políticas de saúde no Brasil (1894-1934). **Educar em Revista**, p. 311-316, 2014.
- OPROMOLLA, D.; OPROMOLLA, D. História. **Noções de hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, p. 1-5, 2000.
- OPROMOLLA, D. V. A. Terapêutica da hanseníase. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 30, n. 3, p. 345-350, 1997.
- OPROMOLLA, D. V. A.; URA, S. **Atlas de hanseníase**. Instituto Lauro de Souza Lima, 2002.
- OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, p. 293-294, 2005.
- OTTENHOFF, T. H. et al. Control of human host immunity to mycobacteria. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 85, n. 1-2, p. 53-64, Jan-Mar 2005.
- PALERMO, M. D. L. et al. Differential expression of the costimulatory molecules CD86, CD28, CD152 and PD-1 correlates with the host-parasite outcome in leprosy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 167-173, 2012.
- PANDYA, S. S. The first international leprosy conference, Berlin, 1897: the politics of segregation. **Indian J Lepr**, v. 76, n. 1, p. 51-70, Jan-Mar 2004.
- PARASCANDOLA, J. Miracle at Carville: The introduction of the sulfones for the treatment of leprosy. **Pharmacy in history**, v. 40, n. 2/3, p. 59-66, 1998.

_____. Chaulmoogra oil and the treatment of leprosy. **Pharmacy in history**, v. 45, n. 2, p. 47-57, 2003.

PARDILLO, F. E. et al. Rapid killing of *M. leprae* by moxifloxacin in two patients with lepromatous leprosy. **Lepr Rev**, v. 80, n. 2, p. 205-9, Jun 2009.

PARDILLO, F. E. et al. Powerful bactericidal activity of moxifloxacin in human leprosy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 9, p. 3113-7, Sep 2008.

PATROCINIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 44, n. 3, p. 311-6, Jun 1 2005.

PATTYN, S. R. et al. *Mycobacterium leprae* persists after treatment with dapsone and rifampicin. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 44, n. 1-2, p. 154-8, Jan-Jun 1976.

PATTYN, S. R. et al. 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. 389-93, Sep 1993.

PEARSON, J. M.; HAILE, G. S.; REES, R. J. Primary dapsone-resistant leprosy. **Lepr Rev**, v. 48, n. 2, p. 129-32, Jun 1977.

PEDLEY, J. Composite skin contact smears: a method of demonstrating the non-emergence of *Mycobacterium leprae* from intact lepromatous skin. **Leprosy Review**, v. 41, n. 1, p. 31-43, 1970.

PEDLEY, J. C. The hypothesis of skin to skin transmission. **Lepr Rev**, v. 48, n. 4, p. 295-7, Dec 1977.

PONNIGHAUS, J. M.; FINE, P. E. Leprosy in Malawi. 1. Sensitivity and specificity of the diagnosis and the search for risk factors for leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 6, p. 803-9, 1988.

QIONG-HUA, P. et al. Early Revelation of Leprosy in China by Sequential Antibody Analyses with LID-1 and PGL-I. **J Trop Med**, v. 2013, p. 352689, 2013.

RAFI, A. et al. *Mycobacterium leprae* DNA from ancient bone detected by PCR. **Lancet**, v. 343, n. 8909, p. 1360-1, May 28 1994.

RAJAGOPALAN, M. S.; BALAKRISHNAN, S.; RAMU, G. Sub clinical infection and the relative risk of developing leprosy: a statistical approach. **Indian J Lepr**, v. 61, n. 2, p. 169-72, Apr 1989.

RAMAPRASAD, P. et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. **Lepr Rev**, v. 68, n. 4, p. 301-15, Dec 1997.

RANI, R. et al. Study of HLA class II alleles by PCR oligotyping in leprosy patients from north India. **Tissue Antigens**, v. 42, n. 3, p. 133-7, Sep 1993.

REECE, S. T. et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clinical and vaccine immunology**, v. 13, n. 3, p. 333-340, 2006.

REES, R. J. Sulphone Resistance in Leprosy. **Lancet**, v. 2, n. 7367, p. 1011-2, Nov 7 1964.

_____. Drug resistance of *Mycobacterium leprae*, particularly to DDS. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 35, n. 4, p. 625-38, Oct-Dec 1967.

REES, R. J.; MCDUGALL, A. C. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. **J Med Microbiol**, v. 10, n. 1, p. 63-8, Feb 1977.

REES, R. J.; MEADE, T. W. Comparison of the modes of spread and the incidence of tuberculosis and leprosy. **Lancet**, v. 1, n. 7846, p. 47-8, Jan 12 1974.

REES, R. J.; PEARSON, J. M.; WATERS, M. F. Experimental and clinical studies on rifampicin in treatment of leprosy. **Br Med J**, v. 1, n. 5688, p. 89-92, Jan 10 1970.

REES, R. J. et al. Long-term treatment of dapsone-resistant leprosy with rifampicin: clinical and bacteriological studies. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 44, n. 1-2, p. 159-69, Jan-Jun 1976.

REIS, E. M. et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 5, p. 447-52, May 2014.

RICHARDUS, J. H. et al. Close contacts with leprosy in newly diagnosed leprosy patients in a high and low endemic area: comparison between Bangladesh and Thailand. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 73, n. 4, p. 249-57, Dec 2005.

RIDLEY, D. S. Reactions in leprosy. **Leprosy review**, v. 40, n. 2, p. 77-81, 1969.

_____. The defect in leprosy. In: (Ed.). **Pathogenesis of Leprosy and Related Diseases**: Butterworth-Heinemann, 1988. p.135-144.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. A classification of leprosy for research purposes. **Lepr Rev**, v. 33, p. 119-28, Apr 1962.

_____. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, Jul-Sep 1966.

ROBBINS, G. et al. Ancient skeletal evidence for leprosy in India (2000 B.C.). **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5669, 2009.

ROBERTSON, J. Leprosy and the elusive *M. leprae*: colonial and imperial medical exchanges in the nineteenth century. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 10, p. 13-40, 2003.

RODRIGUEZ, J. N. et al. Effects of the administration of B663 [G 30 320, Lamprene, clofazimine (Geigy)] on three groups of lepromatous and borderline of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 42, n. 3, p. 276-88, Jul-Sep 1974.

ROTBERG, A. "HANSENIASIS", THE NEW OFFICIAL NAME FOR LEPROSY IN SAO PAULO, BRAZIL*. **International Journal of Dermatology**, v. 8, n. 1, p. 40-43, 1969.

ROY, S. et al. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. **J Infect Dis**, v. 179, n. 1, p. 187-91, Jan 1999.

SADHU, S. et al. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, 2016.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 7, p. e2338, 2013.

SALES, A. M. et al. 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 69-76, 1998.

SANTOS, F. S. D. D.; SOUZA, L. P. A. D.; SIANI, A. C. O óleo de chaulmoogra como conhecimento científico: a construção de uma terapêutica antileprótica. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 15, p. 29-46, 2008.

SANTOS, M. S. D. Lazareto da Ilha Grande: isolamento, aprisionamento e vigilância nas áreas de saúde e política (1884-1942). **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 14, p. 1173-1196, 2007.

SATAPATHY, J.; KAR, B. R.; JOB, C. K. Presence of Mycobacterium leprae in epidermal cells of lepromatous skin and its significance. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 71, n. 4, p. 267-9, Jul-Aug 2005.

SAÚDE, B. M. D. **Portaria no 104, de 25 de janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelece o fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde.** Diário Oficial da União. 18 2011.

SETIA, M. S. et al. Is there a role for rifampicin, ofloxacin and minocycline (ROM) therapy in the treatment of leprosy? Systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 16, n. 12, p. 1541-1551, 2011.

SHANKARKUMAR, U. HLA associations in leprosy patients from Mumbai, India. **Lepr Rev**, v. 75, n. 1, p. 79-85, Mar 2004.

SHARMA, R. et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. **Emerg Infect Dis**, v. 21, n. 12, p. 2127-34, Dec 2015.

SHEPARD, C. C. Acid-fast bacilli in nasal excretions in leprosy, and results of inoculation of mice. **Am J Hyg**, v. 71, p. 147-57, Mar 1960a.

_____. The Experimental Disease That Follows the Injection of Human Leprosy Bacilli into Foot-Pads of Mice. **J Exp Med**, v. 112, n. 3, p. 445-54, Sep 1 1960b.

_____. The nasal excretion of *Mycobacterium leprae* in leprosy. **Int J Lepr**, v. 30, p. 10-8, Jan-Mar 1962.

_____. Temperature Optimum of *Mycobacterium leprae* in Mice. **J Bacteriol**, v. 90, n. 5, p. 1271-5, Nov 1965.

SHEPARD, C. C.; MCRAE, D. H. *Mycobacterium leprae*: viability at 0 degrees C, 31 degrees C, and during freezing. **Int J Lepr**, v. 33, n. 3, p. 316-23, Jul-Sep 1965.

_____. A method for counting acid-fast bacteria. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 36, n. 1, p. 78-82, Jan-Mar 1968.

SHEPARD, C. C. et al. Activity against *M. leprae* of lincomycin and two derivatives, of ampicillin, phosphonomycin and two derivatives of tetrahydronaphthylaminopropylpiperidine. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 39, n. 3, p. 742-4, Jul-Sep 1971.

SHEPARD, C. C. et al. Sensitization or tolerance to *Mycobacterium leprae* antigen by route of injection. **Infection and Immunity**, v. 38, n. 2, p. 673-680, 1982.

SHIH, H. C. et al. Leprosy in a renal transplant recipient: a case report and literature review. **The Journal of dermatology**, v. 32, n. 8, p. 661-666, 2005.

SINGH, P.; COLE, S. T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future microbiology**, v. 6, n. 1, p. 57-71, 2011.

SOEBONO, H. et al. Associations between HLA-DRB1 alleles and leprosy in an Indonesian population. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 65, n. 2, p. 190-6, Jun 1997.

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

SPENCER, J. S. et al. Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 7930-7938, 2005.

SREEVATSA. Leprosy and arthropods. **Indian J Lepr**, v. 65, n. 2, p. 189-200, Apr-Jun 1993.

- SREEVATSA et al. Can sandflies be the vector for leprosy? **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 60, n. 1, p. 94-6, Mar 1992.
- STONER, G. L. et al. Antigen-specific suppressor cells in subclinical leprosy infection. **Lancet**, v. 2, n. 8260-61, p. 1372-7, Dec 19-26 1981.
- STORRS, E. E. et al. Leprosy in the armadillo: new model for biomedical research. **Science**, v. 183, n. 4127, p. 851-2, Mar 1 1974.
- SUNEETHA, S. et al. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. **Leprosy review**, v. 69, n. 4, p. 358-366, 1998.
- TAYLOR, P. M.; ALEXANDER, R. Clofazimine in the treatment of dapsone resistant leprosy. **Lepr India**, v. 48, n. 4 Suppl, p. 709-12, Oct 1976.
- TOLENTINO, J. G.; RODRIQUEZ, J. N.; ABALOS, R. M. Controlled long-term therapy of leprosy with B663 (lamprene, clofazimine) compared with DDS. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 42, n. 4, p. 416-418, Oct-Dec 1974.
- TRINDADE, M. et al. Leprosy in transplant recipients: report of a case after liver transplantation and review of the literature. **Transplant Infectious Disease**, v. 13, n. 1, p. 63-69, 2011.
- TRUMAN, R. Leprosy in wild armadillos. **Lepr Rev**, v. 76, n. 3, p. 198-208, Sep 2005.
- _____. Armadillos as a source of infection for leprosy. **South Med J**, v. 101, n. 6, p. 581-2, Jun 2008.
- TRUMAN, R. et al. Genotypic variation and stability of four variable-number tandem repeats and their suitability for discriminating strains of *Mycobacterium leprae*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 2558-65, Jun 2004.
- TRUMAN, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 11, p. e328, 2008.
- TRUMAN, R. W. et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. **N Engl J Med**, v. 364, n. 17, p. 1626-33, Apr 28 2011.
- TURANKAR, R. P. et al. Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: deciphering the role of environment as a potential reservoir. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 1, p. 121-6, Jan 2012.
- ULRICH, M. et al. IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela: epidemiological observations and a prospective study of the risk of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 59, n. 3, p. 405-15, Sep 1991.
- VAEREWIJK, M. J. et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. **FEMS Microbiol Rev**, v. 29, n. 5, p. 911-34, Nov 2005.

VAN BEERS, S. M. et al. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 62, n. 1, p. 1-9, Mar 1994.

VEZIRIS, N. et al. Resistance of *M. leprae* to quinolones: a question of relativity? **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 11, p. e2559, Nov 2013.

WALSH, G. P. et al. Leprosy as a zoonosis: an update. **Acta Leprol**, v. 6, n. 1, p. 51-60, Jan-Mar 1988.

WEMAMBU, S. et al. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. **The Lancet**, v. 294, n. 7627, p. 933-935, 1969.

WHEAT, W. H. et al. Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 12, p. e3405, Dec 2014.

WHO. **Chemotherapy of leprosy for control programmes : report of a WHO study group**. World Health Organization. Geneva, p.33 p. 1982. (92-4-120675-6)

_____. WHO Expert Committee on Leprosy. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 768, p. 1-51, 1988.

_____. Forty-fourth World Health Assembly. **Resolution WHA**, v. 44, 1991.

_____. WHO Expert Committee on Leprosy. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 874, p. 1-43, 1998.

_____. **Guidelines for global surveillance of drug resistance in leprosy**. World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 2009.

_____. WHO Expert Committee on Leprosy. **World Health Organ Tech Rep Ser**, n. 968, p. 1-61, 1 p following 61, 2012.

_____. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 90, n. 36, p. 461-74, Sep 4 2015.

WILLIAMS, D. L.; GILLIS, T. P. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. **Lepr Rev**, v. 83, n. 3, p. 269-81, Sep 2012.

WILLIAMS, D. L. et al. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. **J Infect Dis**, v. 162, n. 1, p. 193-200, Jul 1990.

WILLIAMS, D. L. et al. Primary multidrug-resistant leprosy, United States. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 179-81, Jan 2013.

WILLIAMS, D. L. et al. Drug resistance in patients with leprosy in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 58, n. 1, p. 72-3, Jan 2014.

WILLIAMS, D. L. et al. Implications of high level pseudogene transcription in *Mycobacterium leprae*. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 1, 2009.

WONG, S. H. et al. Genomewide association study of leprosy. **N Engl J Med**, v. 362, n. 15, p. 1446-7; author reply 1447-8, Apr 15 2010.

WOODS, S. A.; COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. **FEMS Microbiol Lett**, v. 53, n. 3, p. 305-9, Dec 1989.

WOZEL, G. The story of sulfones in tropical medicine and dermatology. **Int J Dermatol**, v. 28, n. 1, p. 17-21, Jan-Feb 1989.

YAMAMURA, M. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 255, n. 5040, p. 12, Jan 3 1992.

YOKOYAMA, K. et al. Amino acid substitutions at position 95 in GyrA can add fluoroquinolone resistance to *Mycobacterium leprae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 2, p. 697-702, Feb 2012.

ZHANG, F. R. et al. Genomewide association study of leprosy. **N Engl J Med**, v. 361, n. 27, p. 2609-18, Dec 31 2009.

CAPÍTULO II

ARTIGO:

EVIDÊNCIA MOLECULAR PARA A VIA AÉREA DE INFECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* E O
PAPEL DOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS NA PERSISTÊNCIA DA HANSENÍASE

CAPÍTULO II – ARTIGO: ARAUJO ET AL 2016

- Versão em português do artigo escrito em inglês (Anexo H) e submetido para a revista *Clinical Infectious Diseases* em 17/02/2016.

Evidência molecular para a via aérea de infecção do *Mycobacterium leprae* e o papel dos portadores assintomáticos na persistência da hanseníase

Sergio Araujo^{*a,b}, Larissa Oliveira Freitas^a, Luiz Ricardo Goulart^{a,b,c,d},
Isabela Maria Bernardes Goulart^{a,b}

^a Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hansenologia, Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; ^b Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; ^c Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil; ^d Dept. de Microbiologia Médica e Imunologia, Universidade da Califórnia em Davis, Davis, CA, EUA.

Título corrido: Via aérea de infecção da hanseníase

* **Autor correspondente:** Sergio Araujo; Tel: +55 (34) 998954956; e-mail: saraujo@gmx.com. Endereço: Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hansenologia (CREDESH/HC/UFU). Av. Aspirante Mega, 77. Bairro Jaraguá. Uberlândia, MG, Brasil. CEP: 38.413-018.

Suporte financeiro: Este projeto foi financiado com recursos de: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Fundo Nacional da Saúde / Ministério da Saúde.

RESUMO

Fundamentação: A hanseníase persiste como problema de saúde pública. A cadeia de transmissão e o mecanismo de infecção não são completamente compreendidos. Neste estudo investigamos a via de infecção e de início da doença, desde a exposição das vias aéreas, colonização e disseminação pela corrente sanguínea. **Métodos:** DNA de *M. leprae* foi detectado por qPCR no vestibulo nasal, mucosa de conchas nasais, e amostras de sangue periférico, além de sorologia anti-PGL-I e testes intradérmicos, do mesmo indivíduo, de 113 pacientes com hanseníase e 104 contatos domiciliares de pacientes (HHCs). Foram empregadas estatísticas bivariadas e análise de correspondência múltipla. **Resultados:** Positividade de DNA entre os pacientes: 66,4% (75/113) no swab nasal, 71,7% (81/113) em biópsias de conchas nasais, 19,5% (22/113) em amostras de sangue; e soropositividade de 62,8% (71/113); com o aumento da incidência para o polo multibacilar (MB) do espectro clínico. Positividade entre HHCs: 18,3% (19/104) para o anti-PGL-I, 49% (51/104) para o swab nasal, 53,8% (56/104) para biópsias nasais, e 6,7% (7/104) para o sangue. Durante o acompanhamento de 5-7 anos, de 104 HHCs, sete desenvolveram hanseníase (6,7%). Risco para o desfecho da doença foi estimado comparando os resultados de HHCs que desenvolvem a hanseníase com aqueles que não foram afetados. Positividade na passagem nasal nem na mucosa foi determinante do início da doença posteriormente; De qualquer forma, a presença no sangue aumentou o risco de desenvolvimento da doença [RR / LR + 5,54 (IC 95% 1,30-23,62)], assim como a soropositividade [LR + 3,69 (IC 95% 1,67-8,16); RR 5,97 (IC 95% 1,45-24,5)]. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem seguramente que a rota aérea de infecção e transmissão é predominante, e que HHCs contribuem para o risco de infecção em si próprio e provavelmente para outros.

Palavras-chave: Hanseníase, epidemiologia, *Mycobacterium leprae*, PCR em Tempo Real Quantitativa, Ensaio de Ligação Imuno-Enzimático, Glicolípido fenólico I.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma das mais antigas doenças infecciosas que assolam a humanidade e ainda hoje continua a ser um problema de saúde pública, particularmente no Brasil, responsável por 92% dos casos novos registrados durante 2014 na região das Américas [1].

Pacientes portadores de hanseníase não tratados são geralmente considerados a principal fonte de transmissão. No entanto, isto contraria mais de trinta anos de um tratamento eficaz e globalmente disponível e a ocorrência de novos casos entre pessoas com nenhum contato anterior com pacientes, indicando que deve haver outras fontes de infecção não reveladas [2-6].

Vários estudos têm demonstrado ampla disseminação de bacilos em regiões endêmicas e que o contato com um paciente de hanseníase foi associado com o aumento do risco de aparecimento da doença [2, 5-7]. Por outro lado, a maioria dos indivíduos expostos não manifesta a doença, o que apoia a hipótese de infecção assintomática e da sua ligação potencial com a cadeia de transmissão do *Mycobacterium leprae* [2, 3, 5, 7].

Bacilos da hanseníase não podem ser cultivados *in vitro* e possuem um tempo de geração extremamente longo (aproximadamente de 15 dias). Além disso, há casos em que os bacilos não são detectados pelos testes disponíveis [8], e o tatu como o único hospedeiro natural e o melhor modelo animal [9], impõem restrições as investigações experimentais.

Assim, os avanços de técnicas moleculares, particularmente envolvendo metodologias baseadas no DNA, mais sensível e específica do que a coloração de bacilos [10, 11], aplicados a estudos epidemiológicos são cruciais para elucidar hipóteses sobre vias de infecção, transmissão e progressão da doença [12, 13].

A fim de investigar a via aérea de infecção e transmissão da hanseníase, este estudo se propôs a detectar a presença do DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal de vestibulos nasais, biópsias das conchas nasais e sangue periférico, do mesmo indivíduo, coletados de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares de pacientes com hanseníase (HHCs). Respostas imunes humorais e mediadas por células dos participantes contra o *M. leprae*, também foram investigadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Participantes

Os ensaios foram realizados em amostras coletadas de 113 pacientes portadores de hanseníase virgens de tratamento e 104 HHCs que foram atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brasil, durante o período de 2003 a 2015. Foram incluídos no estudo apenas indivíduos com conjunto completo de parâmetros clínicos e laboratoriais, e que foram acompanhados por um período mínimo de 5 a 7 anos. O CREDESH é uma unidade de saúde pública que trabalha rotineiramente na prevenção da hanseníase, detecção, busca ativa, e provisão de tratamento e cuidados de saúde para as pessoas afetadas pela doença.

Todos os pacientes com hanseníase foram diagnosticados por uma comissão de especialistas da hanseníase, com base em exames clínicos e laboratoriais. Eles foram classificados de acordo com a sua manifestação clínica dentro do sistema de cinco grupos de Ridley-Jopling [TT (tuberculóide), BT (borderline-tuberculóide), BB (borderline-borderline), BL (borderline-lepromatoso), e LL (lepromatoso)]. Para fins de tratamento, os pacientes também foram categorizados pela classificação operacional em paucibacilar (PB) ou multibacilar (MB).

Contato domiciliar foi definido como uma pessoa que vive ou viveu na mesma habitação como um paciente de hanseníase nos últimos 5 anos antes do diagnóstico do paciente. Todos os HHCs foram inicialmente examinados por médicos especialistas em hanseníase em um exame clínico dermato-neurológico para identificar sinais ou sintomas da doença. Resultados dos HHCs correspondem ao instante do diagnóstico de seus casos índices.

Com a finalidade de análise de dados, os HHCs foram estratificados de acordo com a clínica (TT, BT, BB, BL, LL) e operacional (PB, MB) de seus casos índices. Para a análise do acompanhamento, contatos foram estratificados em dois grupos: afetados (aqueles que desenvolveram da hanseníase) e saudáveis (aqueles sem qualquer sinal ou sintoma de doença). Entre os contatos afetados pela hanseníase, foram excluídos aqueles que apresentavam sinais ou sintomas da hanseníase no momento do seu primeiro exame (coprevalência).

Dados incompletos, resultados inconclusivos em qualquer um dos testes, indivíduos com comorbidades ou tratamentos que poderiam interferir com os resultados, e aqueles que decidiram não participar, foram excluídos deste estudo.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos na Universidade Federal de Uberlândia (# 099/2003) e foi conduzido de acordo com as diretrizes da Declaração de Helsinki. Todos os participantes concordaram em participar neste estudo por consentimento livre e esclarecido. Pacientes e HHCs que desenvolveram a doença receberam cuidados de saúde gratuitos e tratamento adequado para suas doenças.

Métodos

Este estudo avaliou a presença do DNA de *M. leprae* em amostras coletadas a partir de: vestíbulo do nariz por raspagem de ambas as narinas com escovas flexíveis e esterilizadas (swab nasal); mucosa do nariz por biópsia da concha inferior nasal, e sangue periférico por punção venosa. Os participantes também foram avaliados quanto à presença de anticorpos no soro contra o glicolípido fenólico I (PGL-I) nativo de *M. leprae*, por um ensaio imunoenzimático de ligação (ELISA). A resposta de hipersensibilidade tardia específica para antígenos do *M. leprae* também foi avaliada pelo teste intradérmico de Mitsuda, também conhecido como teste cutâneo de lepromina.

Para detectar DNA de *M. leprae*, uma PCR em tempo real quantitativa (qPCR) anteriormente descrita [10] com iniciadores e sonda com alvo um elemento de sequências repetitivas dispersas (RLEP) espécie-específico de *M. leprae* foi realizado em um sistema de PCR em tempo-real ABI7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras de biópsia da pele e esfregaço intradérmico dos pacientes com hanseníase também foram avaliadas pelo mesmo teste de qPCR. A sensibilidade e o menor limite de detecção foram determinados por meio da análise de diluições em série de 2 vezes de *M. leprae* derivado da inoculação em pata de camundongo, com quantidade de início de 1.0×10^7 ($1.0E+7$) bacilos por reação de qPCR (bacilos/ml), a partir das quais o DNA foi extraído e amplificado seguindo o mesmo protocolo de qPCR. Uma diluição seriada padronizada do DNA de *M. leprae* foi utilizada em cada ensaio para estabelecer a curva padrão. A quantificação das amostras automatizada pelo software do instrumento de qPCR foi calculada por interpolação da curva padrão para se obter o número de bacilos/ml.

Para avaliar o estado imunológico dos participantes, um ELISA indireto para detecção de anticorpos IgM circulantes contra o antígeno PGL-I derivado de *M. leprae*, foi realizado em amostras de soro como descrito previamente [14]. Para moderar as variações nos ensaios e entre eles, os resultados de absorvância medidos a 492 nm foram convertidos em um índice ELISA (IE), no qual a densidade ótica (OD) da amostra foi dividida pela OD do ponto de corte ($IE = OD_{amostra} / OD_{ponto\ de\ corte}$). O limiar de positividade foi 1,1.

Para avaliar a resposta de hipersensibilidade mediada por células, uma injeção intradérmica com uma suspensão de *M. leprae* mortos pelo calor, ou seja, o teste de Mitsuda, também foi conduzido. Depois de 21 a 28 dias, mediu-se o diâmetro transversal em milímetros (mm) da endureção (e não do eritema) no local da injeção, e considerado positivo resultado igual ou maior do que 7 mm (≥ 7 mm).

Análises estatísticas

A descrição dos dados e sumarização foram cuidadosamente conduzidos. O conjunto de dados não apresentou distribuição gaussiana; por esta razão foram aplicados métodos estatísticos não paramétricos. Para comparar dois conjuntos independentes de observações (por exemplo, PB vs. MB), foram realizados o teste de Mann-Whitney e o teste-Z de proporções. Para as comparações múltiplas de grupos independentes, foi aplicado o teste de Monte Carlo para proporções e o teste Kruskal-Wallis com análise *posthoc* de Dunn foi utilizado para comparações entre as médias.

Foi utilizado o teste exato de Fisher (bilateral) para investigar associação bivariada por comparações entre pares de dados dicotômicos. Para determinar uma dependência linear estatística entre pares de observações contínuas, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman (r). O coeficiente do teste Kappa (k) avaliou a concordância entre os testes. Para medir a probabilidade de congruência entre os testes em pares, o *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança de 95% (IC 95%) foi estimado por meio da análise de regressão logística.

Para entender melhor a complexa relação entre todos os resultados ao mesmo tempo, a técnica exploratória multivariada da análise de correspondência múltipla (MCA) foi executada. A matriz dos dados foi representada em uma representação gráfica, onde associações foram abordadas pela distância entre os pontos (variáveis, indivíduos e resultados) num espaço geométrico euclidiano (que considera as relações entre ângulos e distâncias no espaço).

Para a análise dos dados de acompanhamento, foi avaliado o desempenho dos testes, sensibilidade e especificidade foram calculadas, e as probabilidades de aparecimento da hanseníase posteriormente foram estimadas pelas razões de verossimilhanças positivas (*positive likelihood ratio* - LR+) e negativas (LR-), Risco Relativo (RR) e IC 95% associados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando software: GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA), XLStat versão 2015.6.01.24996 (Addinsoft, Paris, França) e BioEstat versão 5.3 (Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, Belém, PA, Brasil). O limite de significância estatística foi fixado no nível alfa de 5%.

RESULTADOS

A positividade na qPCR para a detecção do DNA de *M. leprae* entre os pacientes foi: 66,4% (75/113) em swabs nasais, 71,7% (81/113) em biópsias das conchas nasais, e 19,5% (22/113) em amostras de sangue periférico. As quantidades médias de *M. leprae* detectados nas diferentes amostras de pacientes foram as seguintes: 1,8E+07 bacilos/ml em swab nasal, 4,1E+07 bacilos/ml em biópsia de concha nasal, e 9,3E+03 bacilos/ml em amostras de sangue periférico (teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$).

A avaliação da resposta humoral medida pelo ELISA anti-PGL-I demonstraram soropositividade total de 62,8% (71/113), com 3,3 como média do valor de IE. As frequências observadas em todos os resultados nos testes aumentaram em direção ao polo MB do espectro clínico (Tabela 1), excluindo os resultados no teste de Mitsuda; no qual os pacientes PB apresentaram 97% de reações positivas ≥ 7 mm, e apenas 11% dos pacientes MB tinham reações positivas (teste-Z e teste de Mann-Whitney, $P < 0,0001$). As comparações entre os resultados de pacientes PB *versus* (*vs.*) MB foram estatisticamente significantes para todos os parâmetros avaliados (teste-Z e teste de Mann-Whitney, $P \leq 0,05$). De forma correspondente, as diferenças entre os resultados para as manifestações clínicas foram também significativas (teste de Monte Carlo e teste de Kruskal-Wallis, $P < 0,0001$) (Tabela 1).

A exploração bivariada dos dados dos pacientes revelou uma relação de contingência intrincada entre todos os pares de variáveis. O teste exato de Fisher (bilateral) demonstrou que para cada comparação par a par dos dados dicotômicos (positivos ou negativos), houve associações significativas entre cada duas variáveis examinadas [todos os valores de $P \leq 0,003$ (resultado para a comparação da qPCR em sangue *vs.* ELISA anti-PGL-I)]. A dependência linear estatística entre pares de observações, expressa pelo coeficiente r de Spearman (Tabela 2), também mostrou correlações significativas entre cada par de dados contínuos (quantidades médias de bacilos na qPCR, e os índices ELISA anti-PGL-I), exceto para o comparação da qPCR no sangue *vs.* qPCR em swab nasal [todos os valores de $P \leq 0,02$ (resultado para comparação da qPCR em swab nasal *vs.* ELISA anti-PGL-I)]. No que diz respeito à concordância entre os testes, os coeficientes k do teste kappa foram obtidos (Tabela 2). O OR resultante das regressões logísticas também indicou alta probabilidade de congruência entre os testes pareados (Tabela 2).

Tabela 1. Resultados dos testes laboratoriais de acordo com as classificações operacionais e clínicas dos pacientes com hanseníase.

Testes laboratoriais	Pacientes (n=113)												P-valor
	Classificação operacional e clínica												
	PB (n=32)				MB (n=81)								
	N		%		P-valor		N		%				
Positividade ELISA anti-PGL-I [†]	3		9,4		< 0,0001		68		83,9				
Média índice ELISA ± DP	0,7	±	0,6		< 0,0001		4,4	±	3,9				
Positividade teste de Mitsuda [‡]	31		96,9		< 0,0001		9		11,1				
Média da endureção (mm) ± DP	7,6	±	2,7		< 0,0001		1,2	±	2,3				
Positividade qPCR swab nasal	14		43,8		0,0007		61		75,3				
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR swab nasal ± DP	2,3E+04	±	2,9E+04		< 0,0001		2,2E+07	±	8,2E+7				
Positividade qPCR biópsia nasal	15		46,9		0,0001		66		81,5				
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR biópsia nasal ± DP	4,6E+04	±	7,5E+04		< 0,0001		5,0E+07	±	9,8E+07				
Positividade qPCR em sangue	1		3,1		0,0029		21		25,9				
média quantidade (bacilos/ml) qPCR em sangue ± DP	2,8E+03	±	0		-		1,6E+04	±	2,1E+04				
Positividade qPCR biópsia de pele	3		9,4		< 0,0001		60		74,1				
média quantidade (bacilos/ml) qPCR biópsia de pele ± DP	3,6E+03	±	1,1E+03		0,0260		7,3E+07	±	1,5E+08				
Positividade qPCR esfregaço	2		6,2		< 0,0001		63		77,8				
média quantidade (bacilos/ml) qPCR esfregaço dérmico ± DP	2,0E+03	±	2,4E+02		0,0504		1,3E+08	±	2,4E+08				
	TT (n=15)		BT ^{PB} (n=17)		BT ^{MB} (n=28)		BB (n=16)		BL (n=19)		LL (n=18)		P-valor
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Positividade ELISA anti-PGL-I [†]	1	6,7	2	11,8	14	50	16	100	19	100	18	100	< 0,0001
Média índice ELISA ± DP	0,6 ± 0,5		0,8 ± 0,6		1,97 ± 2,3		4,2 ± 2,9		4,4 ± 3,2		8,2 ± 4,5		< 0,0001
Positividade teste de Mitsuda [‡]	15	100	16	94,1	9	47,4	0	0	0	0	0	0	< 0,0001
Média da endureção (mm) ± DP	8,5 ± 2,5		6,6 ± 2,8		3,1 ± 3,2		0,5 ± 1,4		0 ± 0		0 ± 0		< 0,0001
Positividade qPCR swab nasal	6	40	8	47,1	11	39,3	13	81,3	19	100	18	100	< 0,0001
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR swab nasal	1,8E+4		3,3E+4		2,4E+4		1,2E+5		2,6E+7		4,9E+7		< 0,0001
Positividade qPCR biópsia nasal	8	53,3	7	41,2	16	57,1	13	81,3	19	100	18	100	< 0,0001
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR biópsia nasal	8,0E+3		9,0E+4		2,5E+5		1,1E+7		8,0E+07		9,2E+7		< 0,0001
Positividade qPCR em sangue	1	6,7	0	0	2	7,1	0	0	8	42,1	11	61,1	< 0,0001
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR em sangue	2,8E+3		0		2,7E+3		0		9,5E+3		2,3E+4		< 0,0001
Positividade qPCR biópsia de pele	2	13,3	1	5,9	11	39,3	14	87,5	17	89,5	18	100	< 0,0001
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR biópsia de pele ± DP	3,8E+3		3,3E+3		1,7E+4		1,7E+7		4,1E+7		1,9E+8		< 0,0001
Positividade qPCR esfregaço intradérmico	1	6,7	1	5,9	10	35,7	16	100	19	100	18	100	< 0,0001
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR esfregaço dérmico ± DP	1,9E+3		2,2E+3		8,3E+3		1,1E+7		1,5E+8		2,9E+8		< 0,0001

Notas: PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar; TT: tuberculóide; BT: borderline- tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatoso; LL: lepromatoso; DP = Desvio padrão. [†] Para anti-PGL-I, considerado positivo resultado: índice ELISA ≥ 1,1. [‡] Para teste de Mitsuda, considerado positivos resultados: nódulo ≥ 7 mm. Pacientes sob corticoides ou outro tratamento que poderia interferir foram excluídos do cálculo de positividade. P-valor para comparação estatística entre duas proporções (teste-Z), duas médias (teste de Mann-Whitney), seis proporções (Monte Carlo), e seis médias (teste de Kruskal-Wallis).

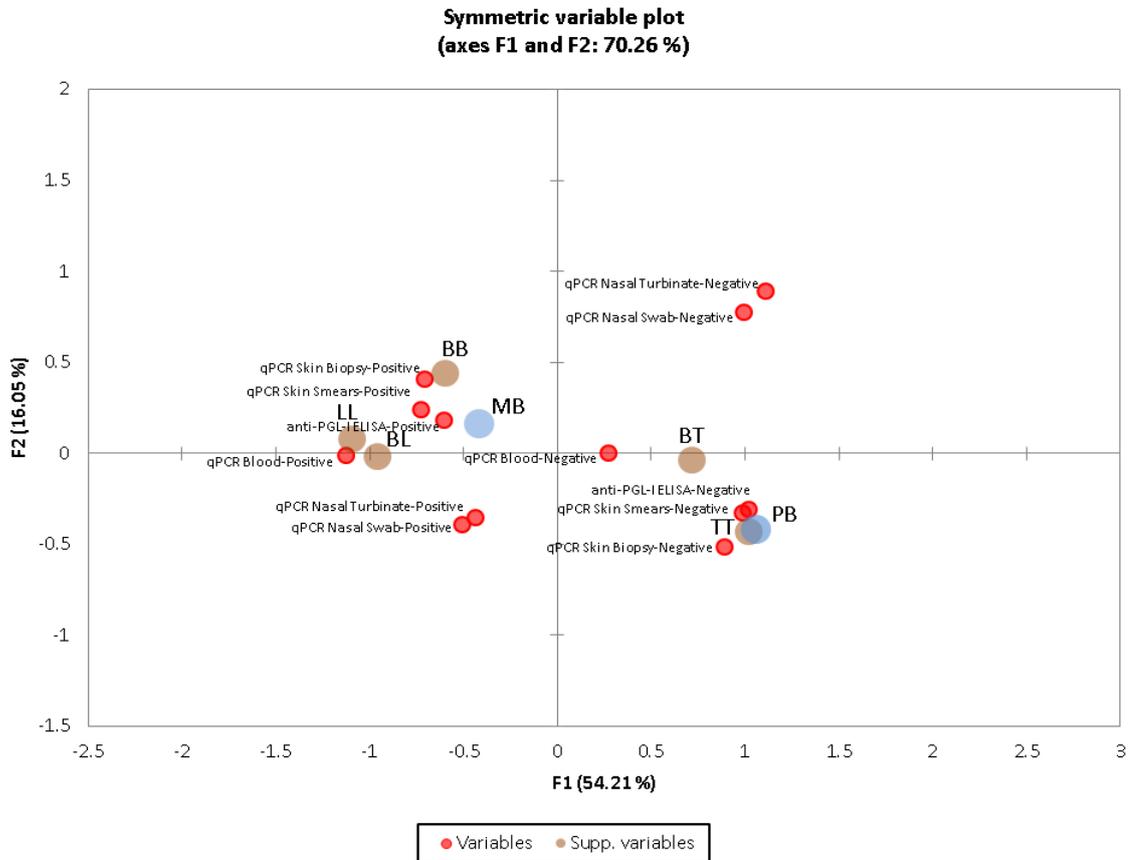
Tabela 2. Coeficientes estatísticos obtidos a partir da análise pareada dos resultados dos testes em amostras de pacientes com hanseníase.

Variáveis contínuas	Coeficientes estatísticos	ELISA anti-PGL-I	qPCR swab nasal	qPCR biópsia nasal	qPCR em sangue	qPCR biópsia de pele
qPCR swab nasal	Spearman <i>r</i>	0,23				
	Kappa <i>k</i>	0,42				
	OR (IC 95%)	6,6 (2,8 – 15,5)				
qPCR biópsia nasal	Spearman <i>r</i>	0,64	0,32			
	Kappa <i>k</i>	0,40	0,63			
	OR (IC 95%)	6,7 (2,8 – 16,3)	24,9 (8,5 – 73,3)			
qPCR em sangue	Spearman <i>r</i>	0,37	0,10	0,45		
	Kappa <i>k</i>	0,19	0,19	0,17		
	OR (IC 95%)	7,8 (2,0 - 31,1)	14,4 (2,6 – 79,3)	+∞		
qPCR biópsia de pele	Spearman <i>r</i>	0,69	0,27	0,67	0,45	
	Kappa <i>k</i>	0,60	0,30	0,33	0,29	
	OR (IC 95%)	18,7 (7,1 - 49,1)	3,8 (1,7 - 8,7)	5,1 (2,1 - 12,3)	24,5 (4,5 - 135)	
qPCR esfregaço dérmico	Spearman <i>r</i>	0,76	0,26	0,74	0,46	0,85
	Kappa <i>k</i>	0,63	0,48	0,38	0,24	0,75
	OR (IC 95%)	22,3 (8,3 - 59,7)	9,5 (3,9 - 23,2)	7,1 (2,9 - 16,3)	10,2 (2,6 - 40,4)	49,9 (16,7 - 141)

A fim de explorar ainda mais a interação complexa entre os resultados dos testes e a classificação dos pacientes, o método estatístico multivariado da MCA foi realizado e os resultados apresentados em uma representação gráfica (Figura 1). A aplicação da MCA foi útil para uma interpretação visual intuitiva das associações entre os parâmetros, onde a distância e ângulo entre os pontos plotados no espaço denotam o perfil do paciente para todos os testes ao mesmo tempo. Os principais agrupamentos observados foram: pontos representando resultados negativos para a qPCR em biópsia de pele, qPCR em esfregaço intradérmico e ELISA anti-PGL-I, próximos de classificações dos pacientes PB e TT; pontos que representam resultados positivos para a qPCR em biópsia de pele, qPCR em esfregaço intradérmico, qPCR em sangue, e ELISA anti-PGL-I, próximos do polo MB e manifestações clínicas BB, BL e LL; e também o agrupamento da positividade ou negatividade para os resultados de qPCR para ambas as amostras de swab nasal e de concha nasal (Figura 1).

Entre os HHCs a positividade geral na qPCR para as diferentes amostras foram: 49% (51/104) para o swab nasal, 53,8% (56/104) para biópsias de conchas nasais, e 6,7% (7/104) para amostras de sangue. As quantidades médias de *M. leprae* entre as diferentes amostras analisadas foram: 1,8E+04 bacilos/ml em swab nasal, 1,3E+05 bacilos/ml em biópsia de concha nasal, e 1,4E+04 para sangue periférico (teste de Kruskal-Wallis, $P = 0,0015$).

Figura 1. Representação gráfica da exploração multivariada dos dados dos pacientes de hanseníase por meio da análise de correspondência múltipla (MCA).



Notas: PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar; TT: tuberculóide; BT: borderline- tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatoso; LL: lepromatoso.

Com relação à sorologia anti-PGL-I, a positividade geral entre HHCs foi de 18,3% (19/104), com 0,7 como IE médio. Anticorpos séricos contra o PGL-I foram positivos para 21% (17/81) dos HHCs com casos índices MB (Tabela 3). Por outro lado, apenas dois (4,5%; 2/23) dos HHCs com caso índice PB apresentaram positividade para anti-PGL-I, mas sem significância estatística (teste-Z, $P = 0,2001$). A comparação entre os índices ELISA médios obtidos para os HHCs de pacientes PB *vs.* os resultados de contatos de pacientes MB foram significativamente diferentes (teste de Mann-Whitney, $P = 0,0037$) (Tabela 3).

Interessantemente, a análise de regressão logística dos dados dos HHCs, demonstrou uma congruência significativa de resultados quando comparados a qPCR em swab nasal *vs.* qPCR em biópsia de concha [OR = 2,3 (IC 95% 1,0 – 5,1)]. Outro resultado notável a partir da análise estatística dos resultados dos HHCs, foi para a comparação da qPCR em concha nasal *vs.* sorologia ELISA anti-PGL-I [teste exato de Fisher, $P = 0,046$; OR = 4,2 (IC 95% 1,2 – 14,8)].

Tabela 3. Resultados dos testes laboratoriais para contatos de pacientes com hanseníase de acordo com as classificações operacionais e clínicas dos casos índices.

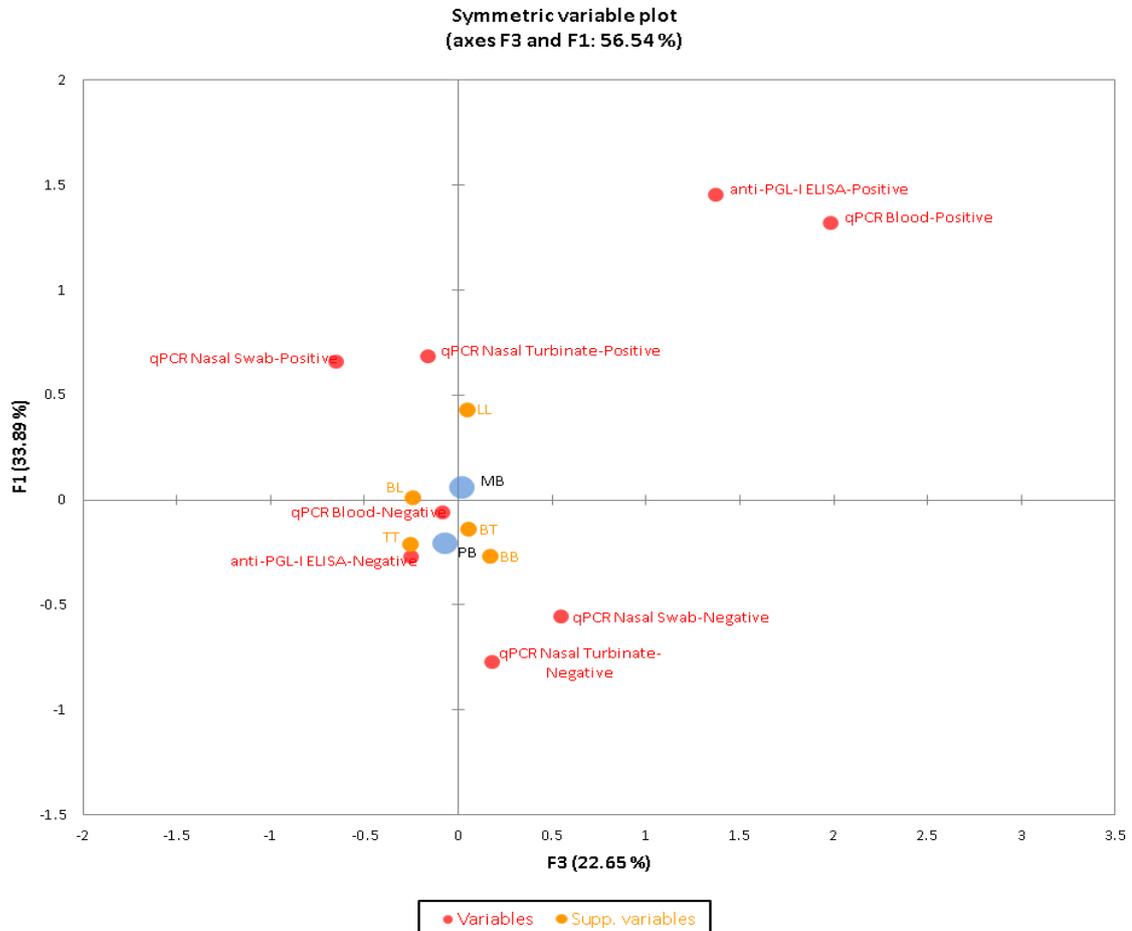
Testes laboratoriais	Contatos domiciliares de pacientes (n=104)												
	Classificação operacional e clínica dos casos índice												
	PB (n=23)				P-valor	MB (n=81)							
	N		%			N		%		N		%	
Positividade ELISA anti-PGL-I [†]	2		8,7		0,2001	17		21					
Média índice ELISA ± DP	0,5 ± 0,5		0,0037			0,8 ± 0,7							
Positividade teste de Mitsuda [‡]	18		78,3		0,1760	50		61,7					
Média da endureção (mm) ± DP	7,7 ± 3,1		0,8348			8,2 ± 4,0							
Positividade qPCR swab nasal	9		39,1		0,3916	42		51,8					
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR swab nasal ± DP	9,3E+03 ± 1,3E+04		0,1862			2,0E+04 ± 3,0E+04							
Positividade qPCR biópsia nasal	13		56,5		0,9562	43		53,0					
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR biópsia nasal ± DP	6,4E+04 ± 1,4E+05		0,421			1,5E+05 ± 4,6E+05							
Positividade qPCR em sangue	2		8,7		1	5		6,2					
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR em sangue ± DP	1,2E+04 ± 1,3E+04		0,4562			1,4E+04 ± 1,7E+04							
	TT (n=3)		BT ^{PB} (n=20)		BT ^{MB} (n=20)		BB (n=16)		BL (n=19)		LL (n=26)		P-valor
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Positividade ELISA anti-PGL-I [†]	0	0	2	10	3	15	3	18,7	2	10,5	9	34,6	0,2168
Média índice ELISA ± DP	0,4 ± 0,2		0,5 ± 0,6		0,7 ± 0,5		0,75 ± 0,8		0,6 ± 0,4		1,0 ± 0,8		0,0455
Positividade teste de Mitsuda [‡]	3	100	15	75	10	50	12	75	14	73,7	14	53,8	0,2021
Média da endureção (mm) ± DP	11 ± 3,6		7,3 ± 2,8		7,5 ± 3,5		7,9 ± 3,2		9,6 ± 5,0		7,9 ± 4,0		0,3078
Positividade qPCR swab nasal	1	33,3	8	40	8	40	7	43,7	9	47,4	18	69,2	0,3020
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR swab nasal	1,5E+04		2,0E+03		3,1E+03		1,5E+03		5,8E+03		2,5E+04		0,0200
Positividade qPCR biópsia nasal	2	66,7	11	55	11	55	6	37,5	12	63,2	14	53,8	0,7740
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR biópsia nasal	1,8E+05		1,5E+04		1,2E+04		1,8E+05		8,2E+04		6,1E+04		0,5037
Positividade qPCR em sangue	0	0	2	10	2	10	2	12,5	0	0	1	3,8	0,6362
Média quantidade (bacilos/ml) qPCR em sangue	0		1,2E+03		3,8E+02		3,9E+03		0		2,5E+03		0,6104

Notas: PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar; TT: tuberculóide; BT: borderline- tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatoso; LL: lepromatoso; DP = Desvio padrão. [†] Para anti-PGL-I, considerado positivo resultados: índice ELISA ≥ 1,1. [‡] Para teste de Mitsuda, considerado positivos resultados: nódulo ≥ 7 mm.

P-valor para comparação estatística entre duas proporções (teste-Z), duas médias (teste de Mann-Whitney), seis proporções (Monte Carlo), e seis médias (teste de Kruskal-Wallis).

Na exploração multivariada dos dados dos HHCs pela MCA, foram observadas associações de agrupamento entre: resultados positivos tanto para qPCR no sangue e para ELISA anti-PGL-I; resultados positivos para ambas qPCR em swab e em biópsia de concha nasal; resultados negativos tanto para qPCR no sangue e anti-PGL-I; e os resultados negativos para ambas qPCR em swab e em biópsia nasal (Figura 2).

Figura 2. Representação gráfica da exploração multivariada de dados dos contatos domiciliares de pacientes de hanseníase por meio da análise de correspondência múltipla (MCA). Classificações operacionais e clínicas referentes ao caso índice do contato.



Notas: PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar; TT: tuberculóide; BT: borderline- tuberculóide; BB: borderline-borderline; BL: borderline-lepromatoso; LL: lepromatoso.

Uma comparação entre os valores médios obtidos para qPCR em pacientes em relação aos valores obtidos para HHCs revelou que, para ambos os locais no nariz (superfície e mucosa) as médias diferiram em grau estatisticamente significativo entre si (teste de Mann-Whitney, $P < 0,0001$). Os valores médios do IE anti-PGL-I em pacientes e em contatos também diferiram com significância estatística (teste de Mann-Whitney, $P < 0,0001$). A comparação entre as médias de bacilos em sangue não apresentou diferença estatística ($P = 0,8186$).

Após a avaliação inicial, o grupo de HHCs foi monitorado por um período de 5 a 7 anos e entre 104 contatos, sete (6,7%) desenvolveram hanseníase. A probabilidade de evolução para a

doença foi estimada comparando os resultados dos que foram afetados pela doença, com os resultados daqueles que não apresentam manifestações clínicas durante o seguimento (Tabela 4).

Tendo considerado na avaliação de risco tanto a razão de verossimilhança e o risco relativo, ficou clara a elevada probabilidade para o aparecimento da doença posteriormente quando observados resultados positivos para a qPCR em amostras de sangue [LR+ e RR 5.54 (1.30 - 23.62)], assim como para a soropositividade anti-PGL-I [LR+ 3.69 (1.67 - 8.16); RR 5.97 (1.45 - 24.5)] (Tabela 4). Uma tabela com os resultados combinados para as qPCRs e ELISA foi adicionada como dados suplementares (Tabela 5).

Tabela 4. Avaliação dos resultados para qPCR, ELISA anti-PGL-I e teste de Mitsuda com base na positividade no momento do diagnóstico do caso índice, observados em contatos domiciliares saudáveis (n=97) em comparação com os contatos que foram afetados pela hanseníase (n=7).

Testes e resultado após acompanhamento	Nº. de positivos	Nº. de negativos	Parâmetros diagnósticos	LR+ (IC _{95%})	RR (IC _{95%})
qPCR swab nasal					
Afetados	6	1	Sensibilidade 85,7%	1,85 (1,28 – 2,68)	6,24 (0,78 – 50,03)
Saudáveis	45	52	Especificidade 53,6%		
qPCR biópsia nasal					
Afetados	4	3	Sensibilidade 57,1%	1,07 (0,55 – 2,08)	1,14 (0,27 – 4,86)
Saudáveis	52	45	Especificidade 46,4%		
qPCR em sangue					
Afetados	2	5	Sensibilidade 28,6%	5,54 (1,3 – 23,62)	5,54 (1,30 – 23,62)
Saudáveis	5	92	Especificidade 94,9%		
ELISA anti-PGL-I [†]					
Afetados	4	3	Sensibilidade 57,1%	3,69 (1,67 – 8,16)	5,97 (1,45 – 24,5)
Saudáveis	15	82	Especificidade 84,5%		
Teste de Mitsuda[‡]					
Afetados	2	5	Sensibilidade 28,6%	2,24 ^a (1,3 – 3,88)	0,21 (0,04 – 1,04)
Saudáveis	66	31	Especificidade 32%		

NOTAS: LR+: Razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio*) Positiva.

RR: Risco Relativo.

[†] Para anti-PGL-I, considerado positivo resultado: índice ELISA $\geq 1,1$

[‡] Para teste de Mitsuda, considerado positivo resultado: nódulo ≥ 7 mm.

^a Razão de verossimilhança (*Likelihood Ratio*) Negativa.

IC_{95%}: Intervalo de Confiança de 95%.

Dados Suplementares

Tabela 5. Relação entre os resultados qualitativos observados entre os pacientes com hanseníase, os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase que continuaram saudáveis, e os contatos que foram afetados pela hanseníase durante o acompanhamento.

qPCR swab nasal	qPCR biópsia nasal	qPCR em sangue	ELISA anti-PGL-I	Pacientes com hanseníase						Contatos domiciliares			
				Total (n=113)		MB (n=81)		PB (n=32)		Saudáveis (n=97)		Afetados (n=7)	
				N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
-	-	-	-	18	15,9	6	7,4	12	37,5	26	26,8	0	-
+	-	-	-	4	3,5	1	1,2	3	9,4	14	14,4	1	14,3
+	+	-	-	12	10,6	2	2,5	10	31,3	20	20,6	1	14,3
-	+	-	-	6	5,3	3	3,7	3	9,4	18	18,6	1	14,3
+	+	+	-	1	0,9	1	1,2	0	-	2	2,1	0	-
-	+	+	-	1	0,9	0	-	1	3,1	0	-	0	-
+	-	+	-	0	0	0	-	0	-	1	1	0	-
-	-	+	-	0	0	0	-	0	-	1	1	0	-
+	-	-	+	2	1,8	2	2,5	0	-	1	1	2	28,5
+	+	-	+	36	31,9	35	43,2	1	3,1	6	6,2	0	-
-	+	-	+	5	4,4	5	6,2	0	-	5	5,2	0	-
+	+	+	+	20	17,7	20	24,7	0	-	1	1	2	28,5
-	+	+	+	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
+	-	+	+	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
-	-	+	+	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
-	-	-	+	8	7,1	6	7,4	2	6,2	2	2,1	0	-

Notas: + = resultado positivo;

- = resultado negativo.

PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar.

DISCUSSÃO

Nosso grupo já publicou trabalhos sobre PCR para detecção de *M. leprae* [15], presença de DNA de *M. leprae* em vias aéreas superiores [2, 12, 16, 17], e DNA de *M. leprae* em sangue de contatos [3] e doadores de sangue [5]. No presente estudo, avaliamos todos estes locais em um mesmo indivíduo, com uma técnica muito mais sensível de PCR quantitativa em tempo real.

Mesmo que não haja nenhuma razão para descartar rotas oportunistas pelas quais bacilos de *M. leprae* poderiam infectar o hospedeiro, é coerente que o sucesso evolutivo por milênios deste patógeno não foi ocasional, e deve haver uma via de infecção preferencial que conferiu a aptidão necessária para este êxito como um patógeno intracelular obrigatório exclusivamente humano.

O *M. leprae* não apresenta motilidade e depende do hospedeiro para a dispersão. Sabe-se que os pacientes não tratados secretam uma quantidade enorme bacilos em aerossol, e suspenso no ar o *M. leprae* poderia alcançar qualquer lugar no ambiente circundante. A detecção de *M. leprae* no solo, na água, ou em outras superfícies em ambientes endêmicos é uma indicação clara deste fundamento lógico. Em contrapartida, o modo pelo qual este entra em um novo hospedeiro não é claro.

A nossa inédita e extensa análise de dados e a caracterização minuciosa dos participantes do estudo, gerou resultados robustos e forneceu evidências moleculares em apoio à nossa teoria de que: o trato respiratório superior, em particular o nariz, é o principal portal para a entrada e saída de *M. leprae*; exposição leva a infecção da mucosa nasal, que desencadeiam respostas imunes (humoral e mediada por células); e se a colonização for bem sucedida, *M. leprae* são transportados pela corrente sanguínea e disseminados aos locais favoráveis de crescimento (isto é, células de Schwann produtoras de mielina). Além disso, os bacilos são difundidos nas populações endêmicas e indivíduos assintomáticos são de suma importância para a persistência insidiosa da transmissão.

Com base nesta hipótese, a exposição a aerossóis contendo *M. leprae* e a sua retenção na cavidade nasal é o primeiro estágio na via de infecção, o que foi confirmado por meio da detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de esfregaços nasais de seis dos sete HHCs que foram afetados pela hanseníase durante o acompanhamento.

A respiração captura quaisquer partículas em suspensão no ar para dentro da passagem do nariz, e o organismo possui vários mecanismos de defesa contra a invasão microbiana. O mecanismo

de transmissão de *M. leprae* mais plausível é que este evade a depuração (*clearance*) epitelial das vias aéreas [18], o que permite a colonização da mucosa, e subsequentemente, gotículas respiratórias que carregam *M. leprae* são exaladas e inaladas, transportadas pelo ar e transmitidas de pessoa para pessoa.

A presença do DNA de *M. leprae* em metade das amostras de swab nasal de HHCs refletiu a alta prevalência de bacilos no nariz de pessoas saudáveis. Embora não acentuadamente associado com a previsão ou o início da infecção, foi uma evidência indireta do papel dos portadores assintomáticos como um modo negligenciado de dispersão para o *M. leprae*.

O segundo estágio na via de infecção foi caracterizado da mesma maneira, pela elevada prevalência de *M. leprae* em amostras de biópsias de conchas nasais de indivíduos assintomáticos observados neste estudo. Uma vez que bacilos infectam com sucesso a mucosa, a resposta imunológica inata irá desempenhar um papel importante contra a proliferação bacilar e sua disseminação [19]. As associações observadas e o aumento nas chances dos resultados positivos para ambas as amostras de swab nasal e biópsia nasal, em pacientes e em HHCs, indicaram que a infecção subclínica parece ser um resultado muito mais comum na interação patógeno-hospedeiro do que geralmente é aceito.

Após a infecção inicial, a heterogeneidade das respostas individuais irá determinar se ocorrerá cura espontânea ou apresentação de uma das manifestações dentro do amplo espectro clínico da doença hanseníase [20]. Não obstante, nós mais uma vez demonstramos a irrefutável existência de portadores sadios de *M. leprae* e de infecção subclínica [2, 18, 19].

Pelo mesmo raciocínio, na sequência da invasão da mucosa pelo *M. leprae*, este é provavelmente drenado pela vasta rede capilar linfática que se origina a partir das conchas nasais. A drenagem para os gânglios linfáticos poderá assim induzir a produção de anticorpos contra o *M. leprae*. Portanto, é provável que a produção de anti-PGL-I esteja presente durante as fases iniciais da interação entre o organismo humano e o *M. leprae*. O presente estudo corrobora com os nossos trabalhos anteriores que demonstraram que a sorologia anti-PGL-I pode auxiliar na determinação daqueles com infecção subclínica e aqueles que estão em maior risco de desenvolver a doença [2, 3, 7, 21].

O nariz humano é plenamente vascularizado com artérias e veias, e nós supomos que após a infecção e colonização, as células infectadas com *M. leprae* são transportadas pela corrente sanguínea, levando até tecidos de colonização secundária e mais favoráveis para o estabelecimento

de *M. leprae*. Quando *M. leprae* foi detectado em amostras de sangue, foi confirmado que este pode entrar com sucesso no sistema circulatório, substanciando uma infecção sistêmica. No entanto, a baixa prevalência observada indicou que este é um evento efêmero, em sua maioria associado aos pacientes BL e LL, consideradas manifestações clínicas sistêmicas. Contudo, foi observado que entre os pacientes e os HHCs que desenvolveram a doença, cuja qPCR no sangue foi positiva, todos eles também foram positivos para as amostras de biópsia nasal, fortalecendo nossa proposta da via de infecção. Por conseguinte, os nossos resultados demonstraram que a presença de *M. leprae* no sangue periférico determinou um elevado risco para o desenvolvimento da hanseníase; como já relatado anteriormente por nosso grupo, mas com outro fragmento específico do genoma de *M. leprae* [3]. Além disso, o único acesso ao compartimento endoneural de um nervo normal e sem traumas seria hematogênico, uma vez que, a barreira de proteção do perineuro isola as células de Schwann.

A frequência geral dos resultados positivos entre HHCs revelou que: *M. leprae* está disseminado entre eles; HHCs estão expostos à elevada carga bacilar, independentemente da manifestação da doença no caso índice; e que, HHCs representam um grupo definido de indivíduos que contribuem para o risco de infecção em si mesmos e muito provavelmente para outros.

Com base nestas evidências, a adoção de quimioprofilaxia para HHCs como uma estratégia de prevenção poderia adicionalmente reduzir a carga de bacilos em comunidades endêmicas, e também auxiliar a interromper a cadeia de transmissão da doença.

Conflitos de interesse: Todos os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Contribuições dos autores: SA, IMBG e LRG conceberam e formularam o estudo; SA e LOF realizaram a análise laboratorial; SA, IMBG, LRG interpretaram os dados e prepararam o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos: Os autores agradecem o empenho da equipe do CREDESH em fornecer excelente atendimento aos pacientes e indivíduos envolvidos na pesquisa, bem como pelo apoio técnico da equipe do Laboratório de Patologia Molecular e Biotecnologia do CREDESH. Agradecemos também a todos os participantes no estudo.

REFERÊNCIAS

1. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2015; 90(36): 461-74.
2. Araujo S, Lobato J, Reis Ede M, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients WHO play potential roles in the disease chain of transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012; 107 Suppl 1: 55-9.
3. Reis EM, Araujo S, Lobato J, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014; 20(5): 447-52.
4. Sharma R, Singh P, Loughry WJ, et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerging infectious diseases* 2015; 21(12): 2127-34.
5. Goulart IM, Araujo S, Filho AB, de Paiva PH, Goulart LR. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. *Journal of clinical microbiology* 2015; 53(10): 3345-8.
6. Mohanty PS, Naaz F, Katara D, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* 2016; 82(1): 23-7.
7. Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Goncalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2008; 15(1): 101-5.
8. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews* 2006; 19(2): 338-81.
9. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Disease models & mechanisms* 2013; 6(1): 19-24.
10. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS neglected tropical diseases* 2008; 2(11): e328.
11. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS neglected tropical diseases* 2014; 8(4): e2655.
12. Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS immunology and medical microbiology* 2005; 44(3): 311-6.
13. Goulart LR, Goulart IM. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Archives of dermatological research* 2009; 301(2): 123-37.
14. Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Leprosy review* 2011; 82(4): 389-401.
15. Goulart IM, Cardoso AM, Santos MS, Goncalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Archives of dermatological research* 2007; 299(5-6): 267-71.
16. Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Goncalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2011; 17(11): 1653-8.
17. Naves Mde M, Ribeiro FA, Patrocinio LG, Patrocinio JA, Fleury RN, Goulart IM. Bacterial load in the nose and its correlation to the immune response in leprosy patients. *Leprosy review* 2013; 84(1): 85-91.
18. Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infection and immunity* 2013; 81(7): 2645-59.
19. Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann cells. *Cellular reprogramming* 2014; 16(1): 9-17.
20. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; 35(4): 365-75.
21. Araujo S, Rezende MM, Sousa DC, et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guerin 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): 739-45.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que a via aérea é a rota preferencial de infecção de *M. leprae* (entrada e saída).

- ⇒ A qPCR para detecção do DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal, passando pela concha nasal, até o sangue periférico demonstrou esta via, haja vista que foram avaliadas no mesmo indivíduo.
- ⇒ A associação significativa entre todos os testes em pacientes, validou a utilização da qPCR e sorologia em contatos.
- ⇒ Em contatos houve associação entre qPCR de swab e concha nasal e entre sorologia e qPCR em sangue, sendo estes dois últimos indicadores de maior risco de adoecimento.

A alta prevalência de resultados positivos entre os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase revelou que:

- ⇒ *M. leprae* está disseminado entre eles, independentemente da classificação do caso índice;
- ⇒ Contatos de pacientes constituem um grupo delimitado que tem maior risco de desenvolver doença e podem facilitar a transmissão para indivíduos suscetíveis;
- ⇒ Sorologia IgM anti-PGL-I e qPCR em sangue determinaram risco, sendo críticos para detectar infecção subclínica; e devem ser utilizados no monitoramento de contatos e sua positividade serve para desencadear exames minuciosos para diagnóstico precoce.

Com base nestas evidências, sugere-se a adoção da quimioprofilaxia diferenciada em contatos visando prevenir a doença e interromper a cadeia de transmissão.

APÊNDICE

APÊNDICE – Protocolos

COLETA DE AMOSTRAS

Swab nasal

A coleta do swab nasal foi realizada com a introdução de pequenas escovas flexíveis estéreis e esfregando a passagem nasal via 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). A amostra foi armazenada à temperatura de 4°C e encaminhada para realização dos exames.

Biópsia de concha nasal

A biópsia da mucosa nasal foi realizada utilizando espéculo nasal número 3, espelho frontal e lanterna de cabeça. Um pequeno chumaço de algodão embebido com 0,5 ml de solução de tetracaína a 2% e 0,5 ml de 1: 1.000 epinefrina foi colocado ao longo da concha nasal inferior por 10 min. Logo depois, 0,5 ml de lidocaína a 2% com adrenalina 1: 200.000 foi infiltrado 1-2 cm anterior à borda curva da concha inferior. Biópsia desta área foi realizada com uma pequena pinça específica para biópsia deste tecido, obtendo-se uma amostra da mucosa nasal de aproximadamente 2,0x1,5x0,5 mm. Para evitar o sangramento após a biópsia, gaze com neomicina foi colocada sobre a área da biópsia.

Sangue Periférico

Foi feita assepsia do local com algodão embebido em álcool 70%, seguida por punção da veia braquial com sistema de coleta à vácuo do sangue venoso periférico. Para a realização do exame de qPCR foi coletado um tubo de 4 ml com EDTA e para a o teste ELISA anti-PGL-1 foi coletado um tubo de 8 ml com gel separador. A amostra foi armazenada à temperatura de 4°C e encaminhada para realização dos exames.

Esfregação dérmico

Uma alíquota de cada raspado dérmico de no mínimo cinco locais e máximo de 7 locais (lóbulos das orelhas, cotovelos, joelhos e 1 lesão ativa), foram coletadas e depositadas em um único microtubo estéril tipo eppendorff contendo 500 µL de tampão de lise nuclear (TLN – NaCl 400 mM, EDTA, pH 8,0 50 mM e Tris-Cl pH 8,0 25 mM). A amostra foi armazenada à temperatura de 4°C e encaminhada para realização dos exames de baciloscopia e qPCR.

Biópsia de lesão de pele

Inicia-se com antissepsia da região com álcool iodado, seguida de anestesia local subcutânea de lidocaína a 2%. Foi utilizado *punch* de 4 mm, obedecendo às linhas de tensão da pele, retirando-se um fragmento com o mesmo diâmetro, atingindo a hipoderme. A sutura foi feita com mononylon 2-0, pontos separados e curativo. A amostra foi armazenada em nitrogênio líquido e encaminhada para realização do exame de qPCR.

EXAMES LABORATORIAIS

Protocolo para a extração de DNA de amostras de swab nasal e esfregação dérmico

Ao Tampão de Lise Nuclear (TLN) (NaCl 400 mM, EDTA pH 8,0 50 mM, Tris-HCl pH 8,0 25 mM), contendo as amostras de swab nasal ou esfregação dérmico foram acrescentados 40 µl de dodecil-dissulfato de sódio (SDS) 10%, 25 µl de proteinase K a 10 µg/ml encubando-se a 65°C. Após 18h, os tubos foram retirados do banho-maria e foram adicionados 250 µl de Tris-HCl (1M pH 8,0), 250 µl clorofórmio PA e 500 µl de fenol (pH 8,0). Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 5 minutos. Centrifugaram-se os tubos a 10.000 rpm por 10 minutos. A seguir, 700 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos estéreis onde foram adicionados 700 µl de etanol absoluto com posterior incubação a -20°C

por 24h. Na seqüência, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 1.000 µl de etanol 75%, centrifugando os tubos por mais 10 minutos à velocidade de 14.000 rpm. Enfim, o sobrenadante foi descartado deixando o precipitado secar. Após a secagem, os precipitados foram diluídos em 30 µl de água ultra pura e armazenados à -20°C.

Extração de DNA de amostras de biópsia de concha nasal e biópsia de pele

As biópsias de lesão de pele foram acondicionadas a -20° C a fim de garantir a conservação do DNA. No momento da extração, as biópsias foram picotadas com um bisturi, pesadas em balança de precisão e transferidas para tubos de 2 mL, onde foram adicionados 500 µl de TLN (NaCl 400mM; EDTA 50mM pH 8,0; Tris-HCl 25 mM pH 8,0), 30 µl de proteinase K (10mg/mL) e 40 mL de SDS (10%). Em seguida, os tubos foram incubados a 65°C. Após 18h, foram retirados do banho-maria e adicionados 250 µl de Tris-HCl (1M pH 8,0), 250 µl clorofórmio PA e 500 µl de fenol (pH 8,0). Os tubos foram homogeneizados e deixados em repouso por 5 minutos. Centrifugou-se os tubos a 10.000 rpm por 10 minutos. A seguir, 700 µl do sobrenadante foram transferidos para tubos estéreis onde se colocou 700 µl de etanol absoluto, com posterior incubação a -20°C por 24h. Na seqüência, os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 1000 µl de etanol 75%, centrifugando os tubos por mais 10 minutos à velocidade de 14.000 rpm. Enfim, o sobrenadante foi descartado deixando o precipitado secar. Após a secagem, os precipitados foram diluídos em 50µl de água ultra pura e armazenados à -20°C.

Extração de DNA de sangue periférico

Para a extração do DNA do *M. leprae* foi pipetado 500 µl de sangue total, adicionado 250 µl de Tris-HCl 1M (pH 8,0) e 500 µl de fenol (pH 8,0), homogeneizado e deixado em repouso por 5 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por dez minutos. Foi retirado então o sobrenadante e depositado em um tubo limpo, completado com etanol absoluto e deixado de um dia

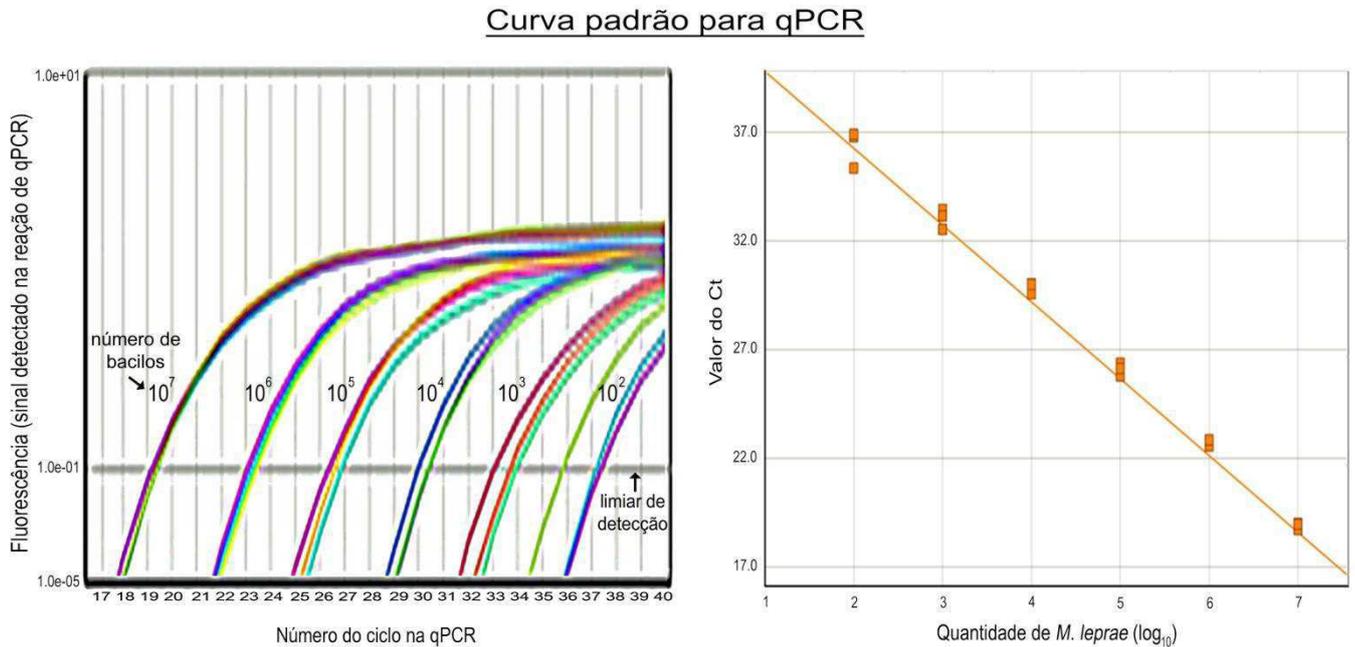
para o outro a -20°C . Posteriormente o material foi centrifugado a 15.000 rpm por 15 minutos a 4°C , descartado o sobrenadante, o precipitado lavado com etanol 75% e novamente centrifugado a 15.000 rpm, dessa vez por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado deixado para secar. O precipitado foi então diluído em 50 μl de água ultra pura e adicionado aos reagentes da PCR.

Detecção do DNA de M. leprae por qPCR

Com exceção das amostras de sangue, foi realizada a digestão enzimática das células homogeneizadas em solução com Proteinase K. Foi realizada a extração do DNA das amostras por técnica de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e suspensão do precipitado em etanol. O DNA resultante foi suspenso em água ultrapura. O controle interno da reação de qPCR foi realizado pela amplificação de um fragmento do gene humano NRAMP-1 (Proteína 1 associada à resistência natural em macrófago, do inglês *Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1*) utilizando o sistema SYBR Green (iniciadores 5'-GACCTGACTCTGTGTGTGTACG-3' e 5'-TTCTGTGCCTCCCAAGTTAGC-3'). Para a detecção do DNA de *M. leprae* foram utilizados iniciadores e sonda descritos e validados em um estudo anterior (TRUMAN et al., 2008), que amplificam um fragmento específico da região de elementos repetitivos RLEP, com sequência presente nas quatro famílias de repetições dispersas no genoma de *M. leprae* (RLEP 1, 2, 3 e 4). A sequência selecionada foi: 5'-GCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCA*tcgatgatccggccgtcggcg*GCACATACGGCAACCTTCTAGCG-3', sendo que as letras maiúsculas representam as sequências em que os iniciadores foram construídos e a sequência interna em itálico foi selecionada para a construção da sonda *TaqMan*. Esta sonda é um fragmento de DNA marcado com fluoróforos usado para hibridizar com as sequências de nucleotídeos internas do fragmento de DNA amplificado na qPCR. No processo da amplificação, quando ocorre a síntese de um novo fragmento de DNA alvo a sonda *TaqMan* é degradada devido à atividade exonuclease da polimerase de DNA, resultando em um sinal fluorescente que é captado pelo instrumento de qPCR a cada ciclo de amplificação. Quando as sequências dos iniciadores foram analisadas em um programa de

análise de sequências de nucleotídeos (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) procurando similaridades com o genoma completo de *M. leprae*, 19 regiões foram identificadas com sequências idênticas. Por conseguinte, a amplificação de um único cromossoma de *M. leprae* com estes iniciadores deve resultar em 19 cópias de RLEP. As reações de PCR em tempo real foram realizadas conforme instruções do fabricante do reagente TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Aproximadamente 200 ng de DNA (2 ul) extraído das amostras clínicas foram utilizados em uma reação de 25 µl, consistindo no reagente Taqman Universal PCR Master Mix, 200 nM de cada iniciador e 100 nM de sonda. As condições dos ciclos de PCR foram 40 ciclos com a temperatura de 60°C para anelamento e extensão durante 60 segundos, e temperatura de 95°C para desnaturação durante 15 segundos. Todas as reações foram processadas e resultados analisados no equipamento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os resultados foram obtidos de acordo com o primeiro ciclo de amplificação a produzir um sinal de fluorescência detectável (*cycle threshold* – Ct). Os valores desconhecidos foram interpolados automaticamente pelo software do sistema com uma curva padrão formada a partir da diluição seriada de amostras com concentrações previamente conhecidas, obtidas por meio de amostras com quantificação de bacilos por contagem direta, diluídas em série, com posterior extração e purificação do DNA. A curva padrão foi avaliada e o valor da inclinação da reta (do inglês *slope*), que indica a sensibilidade do teste, permitiu o cálculo da eficiência da reação (Figura 1). A medida da eficiência da qPCR é dada pela equação: $E = 10^{(-1/x)}$; na qual “x” representa a inclinação da curva padrão. Um fator de inclinação da curva entre -3,1 e -3,6 equivale à eficiência da reação entre 90 e 110%, que são valores aceitáveis para a maioria das aplicações de quantificação de nucleotídeos por qPCR. Os fatores da curva padrão deste estudo foram: inclinação da reta -3,42; coeficiente de determinação de correlação R^2 0,9996; e eficiência da reação de 96%.

Figura 1. Gráficos do resultado da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) para a diluição seriada de amostras com concentrações de bacilos de *M. leprae* previamente conhecidas, utilizadas para obtenção da curva padrão.



ELISA anti-PGL-1

Para detectar os anticorpos IgM no soro, um ELISA contra o antígeno PGL-I nativo de *M. leprae* foi realizado de acordo com metodologia previamente descrita (LOBATO et al., 2011a). Resumidamente, 50 µl do antígeno diluído a 10 µg/ml 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 por 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 lavados 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 por 15 min. A reação foi interrompida com 25 µl de ácido sulfúrico e a densidade ótica (DO) mensurada com um espectrofotômetro à 492nm. Os resultados do ELISA foram analisados com base no valor do ponto de corte adicionando três desvios padrões na média da DO de três amostras em branco (sem amostra), mais três amostras de controles negativos por placa. As amostras controle negativas foram estabelecidas previamente com indivíduos sem história de hanseníase e com soro negativo para anticorpos anti PGL-I.

Teste de Mitsuda

O teste de Mitsuda foi utilizado para avaliar a imunidade celular específica ao *M. leprae*. Neste procedimento uma suspensão com 0,1 ml de Mitsudina, uma suspensão de 6×10^7 bacilos/ml mortos pelo calor produzida pelo Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL-Bauru, SP), foi injetada intradermicamente na face anterior do antebraço direito, 2 a 4 cm abaixo da dobra antecubital. As leituras foram feitas após 21 a 28 dias, observando a presença de pápula, nódulo ou ulceração no ponto de inoculação. Com uma régua milimetrada foi mensurado o diâmetro transversal em milímetros (mm) da endureção (não do eritema) no local da injeção. Para fins de análise, foram considerados como resultados positivos neste estudo medidas superiores ou iguais a 7 mm.

ANEXOS

ANEXO A – FICHA DE NOTIFICAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DE CASOS DE HANSENÍASE

República Federativa do Brasil
Ministério da SaúdeSINAN
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO
FICHA DE NOTIFICAÇÃO/ INVESTIGAÇÃO HANSENÍASE

Nº

Caso confirmado de Hanseníase: pessoa que apresenta uma ou mais das seguintes características e que requer poliquimioterapia:
- lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo (s) com espessamento neural; baciloscopia positiva.

Dados Gerais	1	Tipo de Notificação		2 - Individual				
	2	Agravado/doença		Código (CID10)	3 Data da Notificação			
	HANSENÍASE		A 3 0 . 9					
Dados Gerais	4	UF	5	Município de Notificação	Código (IBGE)			
	6	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código	7 Data do Diagnóstico			
Notificação Individual	8	Nome do Paciente			9	Data de Nascimento		
	10	(ou) Idade	11	Sexo	12	Gestante		
	1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano		M - Masculino F - Feminino I - Ignorado	1 - 1º Trimestre 2 - 2º Trimestre 3 - 3º Trimestre 4 - Idade gestacional Ignorada 5 - Não 6 - Não se aplica 9 - Ignorado				
	14		Escolaridade			13	Raça/Cor	
	0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª a 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica		1 - Branca 2 - Preta 3 - Amarela 4 - Parda 5 - Indígena 9 - Ignorado					
15	Número do Cartão SUS			16	Nome da mãe			
Dados de Residência	17	UF	18	Município de Residência	Código (IBGE)	19	Distrito	
	20	Bairro		21	Logradouro (rua, avenida,...)		Código	
	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)		24	Geo campo 1	
	25	Geo campo 2		26	Ponto de Referência		27	CEP
28	(DDD) Telefone		29	Zona		30	Pais (se residente fora do Brasil)	
				1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado				
Dados Complementares do Caso								
Ocupação	31	Nº do Prontuário			32	Ocupação		
Dados Clínicos	33	Nº de Lesões Cutâneas	34	Forma Clínica		35	Classificação Operacional	
			1 - I 2 - T 3 - D 4 - V 5 - Não classificado		1 - PB 2 - MB		36	Nº de Nervos afetados
Atendimento	37	Avaliação do Grau de Incapacidade Física no Diagnóstico					0 - Grau Zero 1 - Grau I 2 - Grau II 3 - Não Avaliado	
	38	Modo de Entrada						
	1 - Caso Novo 2 - Transferência do mesmo município (outra unidade) 3 - Transferência de Outro Município (mesma UF) 4 - Transferência de Outro Estado 5 - Transferência de Outro País 6 - Recidiva 7 -Outros Reingressos 9 - Ignorado							
Dados Lab.	39	Modo de Detecção do Caso Novo						
	1 - Encaminhamento 2 - Demanda Espontânea 3 - Exame de Coletividade 4 - Exame de Contatos 5 - Outros Modos 9 - Ignorado							
Tratamento	40	Baciloscopia						
	1. Positiva 2. Negativa 3. Não realizada 9. Ignorado							
Med. Contr.	41	Data do Início do Tratamento		42	Esquema Terapêutico Inicial			
					1 - PQT/PB/ 6 doses 2 - PQT/MB/ 12 doses 3 - Outros Esquemas Substitutos			
Med. Contr.	43	Número de Contatos Registrados						
Observações adicionais:								
Investigador	Município/Unidade de Saúde				Código da Unid. de Saúde			
	Nome		Função		Assinatura			
Hanseníase		Sinan NET		SVS		30/10/2007		

ANEXO B – ARTIGO: ARAUJO ET AL 2015.



Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 48(6):739-745, Nov-Dec, 2015
<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0245-2015>

Major Article

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

Sergio Araujo^{[1],[2]}, Marina Monteiro Figueiredo Rezende^[1],
 Diogo Carrijo Rodrigues de Sousa^[1], Maráisa Resende Rosa^[1],
 Danielle Cristina dos Santos^[1], Luiz Ricardo Goulart^{[1],[2],[3]}
 and Isabela Maria Bernardes Goulart^{[1],[2]}

[1]. Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase, Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. [3]. Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

ABSTRACT

Introduction: Despite multidrug therapy, leprosy remains a public health issue. The intradermal *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) vaccine, Mitsuda test (lepromin skin test), and anti-phenolic glycolipid I (PGL-I) serology are widely used in leprosy studies and have shown great epidemiological value. **Methods:** This longitudinal study evaluated the relative risks and benefits of these three tools by comparing results observed in household contacts (HHCs) of leprosy patients who developed leprosy with those of HHCs who did not in a population of 2,992 individuals monitored during a 10-year period. **Results:** Seventy-five (2.5%) new leprosy cases were diagnosed, including 28 (0.9%) co-prevalent cases. Therefore, for the risk-benefit assessment, 47 (1.6%) HHCs were considered as truly diagnosed during follow-up. The comparison between healthy and affected contacts demonstrated that not only did BCG vaccination increase protection, but boosters also increased to 95% relative risk (RR) reduction when results for having two or more scars were compared with having no scars [RR, 0.0459; 95% confidence interval (CI), 0.006-0.338]. Similarly, Mitsuda reactions >7mm in induration presented 7-fold greater protection against disease development compared to reactions of 0-3mm (RR, 0.1446; 95% CI, 0.0566-0.3696). In contrast, anti-PGL-I ELISA seropositivity indicated a 5-fold RR increase for disease outcome (RR, 5.688; 95% CI, 3.2412-9.9824). The combined effect of no BCG scars, Mitsuda reaction of <7mm, and seropositivity to anti-PGL-I increased the risk for leprosy onset 8-fold (RR, 8.109; 95% CI, 5.1167-12.8511). **Conclusions:** The adoption of these combined assays may impose measures for leprosy control strategies.

Keywords: Epidemiology. Leprosy. Immunology.

INTRODUCTION

Early diagnosis of and chemotherapy for symptomatic patients are the mainstays of the global control measures to contain leprosy, also known as Hansen's Disease. Despite three decades of multidrug therapy (MDT) treatment and more than 20 years of the World Health Organization (WHO)'s elimination campaign^[1], Brazil remains the second most affected country in the world, with 31 064 new cases reported in 2014^[2].

Currently, there is no specific vaccine for leprosy, which would be the primary method of prevention. Hence, the chemoprophylaxis of contacts is considered to be additional support required to interrupt the chain of transmission, especially in endemic countries where leprosy continues to be a public health concern^{[3],[4]}.

Leprosy is a chronic infectious disease that presents a broad immunological spectrum in which the clinical manifestations correlate with the individual type of immune response against the pathogen^[5].

There is a balance among genetic and environmental factors and innate and acquired immune responses, by which the resolution of an infection may occur as follows: in susceptible individuals, from a highly bacilliferous disease to the granulomatous containment of infection; or, as expected in individuals not susceptible, spontaneous cure^[6].

Intradermic vaccination with *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), an attenuated strain of *Mycobacterium bovis*, has been

Corresponding author: Dr. Sergio Araujo, National Hansen's Disease Programs/
 Laboratory Research Branch/School of Veterinary Medicine/Louisiana State
 University, Skip Bertman Drive, Baton Rouge, 70803 Louisiana, USA.
Phone: 1 225 614-8290
e-mail: saraujo@gmx.com
Received 20 July 2015
Accepted 28 September 2015

widely used across the globe as a preventive strategy against tuberculosis (TB)⁽⁷⁾. The *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* bacilli are considered the only human exclusive pathogenic mycobacteria and they share host immune evasion similarities⁽⁸⁾. BCG vaccination has been associated with leprosy protection since the 1960s⁽⁹⁾, and due to common immunopathogenic characteristics between leprosy and TB, the cross-protection against both diseases with modified BCG vaccines continues to be evaluated⁽¹⁰⁾.

Universal BCG immunization is currently applied to all children in Brazil, with boosters given to immediate contacts of new cases of leprosy⁽¹¹⁾. The cell-mediated immunity (CMI) elicited at the site of inoculation after BCG vaccination is evidenced by a definite scar formation⁽¹²⁾.

Household contacts (HHCs) of leprosy patients comprise a recognizable group of individuals who lived in close proximity to a leprosy patient before the patient was diagnosed. There are indications that healthy carriers and individuals with subclinical infection may participate in the dissemination of *M. leprae* to susceptible persons in endemic communities, and HHCs may be among such carriers. The monitoring of HHCs of leprosy patients also promotes early diagnosis of the disease⁽⁶⁾.

The Mitsuda test, or lepromin skin test, is an intradermal injection with a bacilli suspension of heat-killed *M. leprae*, usually performed during the clinical examination of suspected cases of leprosy. After 21 days, the CMI response elicited against *M. leprae* antigens can be visually observed by the induration at the site of injection. Multibacillary (MB) patients most often do not show any reaction. Paucibacillary (PB) patients usually display positive reactions⁽¹³⁾. For the HHCs of leprosy patients, a strong positive response to the Mitsuda test is associated with increased protection against the disease^{(14) (15)}.

In contrast, the humoral response with the production of antigen-stimulated antibody against *M. leprae* does not confer resistance to infection. The titration of immunoglobulin M (IgM) antibodies in serum against phenolic glycolipid I (PGL-I; a species-specific cell wall interface of *M. leprae*) in patients is directly proportional to the bacillary load, with increased levels associated with more severe forms of the disease⁽⁶⁾ and therefore detected primarily in MB patients.

The serology for antibodies against PGL-I (anti-PGL-I) has also been used to measure the effectiveness of treatment⁽¹⁶⁾. Among HHCs, anti-PGL-I seropositive results indicate a greater risk for disease onset, particularly for the development of MB leprosy^{(14) (15)}.

The BCG vaccination, anti-PGL-I serology, and Mitsuda test response have been demonstrated to be excellent epidemiological tools and important assets for monitoring leprosy contacts at higher risk for disease development and post-exposure prophylaxis. This investigation is an extensive comparative analysis of the risk to the relative benefit of these tools in a 10-year follow-up survey with a very large population of HHCs of leprosy patients in an endemic setting.

METHODS

This study was a longitudinal survey of 2,992 HHCs of leprosy patients who attended the National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH) at the *Hospital das Clínicas* (HC) of the Federal University of Uberlândia (UFU), Minas Gerais, Brazil, during the 10-year period from 2002 to 2013.

A household contact was defined as a person who lives or has lived in the same dwelling as a leprosy patient in the last 5 years prior to the patient's diagnosis.

The CREDESH/HC/UFU is a public health unit with a multi-professional staff that includes physicians, nurses, a physiotherapist, a prosthetist, a pharmacist, a psychologist, social care, a clinical analysis laboratory, and others. The CREDESH/HC/UFU routinely works on leprosy prevention, particularly by monitoring HHCs, actively searching for early cases, and administering treatment to those affected by the disease.

For the purpose of data analysis, the HHCs were stratified according to the clinical classifications of their index cases, as per the Ridley-Jopling classification: TT (tuberculoid), BT (borderline-tuberculoid), BB (mid-borderline), BL (borderline-lepromatous), and LL (lepromatous), and also per operational classifications for PB or MB.

All HHCs were examined for signs or symptoms of the disease by specialized physicians experienced in leprosy diagnosis and treatment during annual dermato-neurological clinical examinations.

At their first examination, HHCs' vaccination data were assessed according to the presence and number of BCG scars (0, 1, or 2 scars). HHCs underwent the Mitsuda test (lepromin skin test), with results observed 21-28 days later. Results were stratified according to the transverse diameter in millimeters (mm) of the induration (not erythema) at the site of the injection. At the time of the Mitsuda result observation, those individuals without BCG scars or with only one scar received a booster of the BCG vaccine.

The anti-PGL-I enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect circulating IgM antibodies in the serum against the *M. leprae*-native PGL-I molecule and was performed as previously described⁽¹⁶⁾. Results for the antibody titers measured by optical density (OD) at 492 nm were converted into an ELISA index (EI) ($EI = OD_{\text{sample}} / OD_{\text{cut-off}}$), as described previously⁽⁴⁾. EI values >1.1 were considered positive.

Incomplete data, inconclusive results in any of the tests, and individuals with comorbidities or treatments that could interfere with the results were excluded from the analysis.

Additional inclusion criteria were: a minimum period of 7 years of follow-up, the availability of results for all tests, and medical records with information about the clinical form and operational classification of the index case. Contacts without complete information and those who decided not to participate were excluded from this study.

Results corresponded to the time point at diagnosis of their index case. For follow-up analysis, contacts were further stratified into two classes: affected (those who developed leprosy) and healthy (those without any sign or symptom of disease).

Among the contacts affected by leprosy, we excluded from the risk-benefit assessment those who presented signs or symptoms at the time of their first examination. That is, the disease was present at the same time point of the diagnosis of the index cases (co-prevalence).

Those who did not present any sign or symptom of the disease at their first examination and developed the disease during follow-up were considered to be truly affected; therefore, their data were applied for the assessment of the association of results with disease outcome.

The research protocol was approved by the institutional review board at the Federal University of Uberlândia (#099/2003) and was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki of 1964 and its later revisions. All participants agreed to take part in this study with written informed consent. Patients and their HHCs that developed the disease received free health care, were examined and classified according to their clinical and operational classifications, and received adequate treatment for their illnesses.

Statistical analyses were performed with BioEstat 5.0 software (Open license). The probability of a disease outcome during the follow-up given the presence of a specific factor was measured by calculating the relative risk (RR) along with the associated 95% confidence interval (95% CI). Significance was set at $p = 0.05$.

RESULTS

Among the 2,992 HHCs of leprosy patients monitored during the study's 10-year period, 75 (2.5%) new cases were diagnosed. Of these, 57.3% (43/75) were classified at diagnosis as PB cases, and most (73.3%; 55/75) presented borderline manifestations. **Table 1** shows that forty-seven (1.6%; 47/2992) contacts were diagnosed after their second examination during the follow-up and were therefore not considered co-prevalent cases. Most HHCs were contacts of MB index cases (84%; 63/75), particularly contacts of LL cases (57.3%; 43/75).

The majority of new cases diagnosed among the HHCs (80%; 60/75) occurred during the first year of follow-up, including 28 co-prevalent cases diagnosed at their first examination. Among the 47 contacts that truly developed leprosy during follow-up, 68% (32/47) presented signs or symptoms during the first year of follow-up and 15% (9/47) in the second and third years.

Among the new cases diagnosed during follow-up, 76.6% (36/47) had only one BCG vaccination scar at their first examination. These contacts received an extra dose of the BCG vaccine; 80.6% (29/36) presented signs or symptoms during the first year of follow-up, none in the second year, and, for the next 7 years, one contact was diagnosed per year.

A comparison of the number of BCG scars observed in healthy versus affected contacts demonstrated that the BCG vaccination not only increased protection but also that boosters exponentially increased the protective effect. A stepwise analysis of the RR was performed for the presence of 0, 1, or 2 scars, and the linear regression curve showed a strong correlation ($r = 0.9889$). The lowest RR (0.0459; 95% CI, 0.0062-0.3376) was observed for comparison of the results of individuals with 2 or more scars versus those with none, representing a 95% RR reduction for the development of disease in individuals vaccinated twice with BCG (**Figure 1A**).

Regarding the specific CMI response elicited against heat-killed *M. leprae* observed through the late-hypersensitive response of the Mitsuda test, contacts with induration >7 mm had 7-fold greater protection against disease onset than did contacts with indurations of 0-3mm (RR, 0.1446; 95% CI, 0.0566-0.3696) (**Figure 1B**).

The evaluation of the humoral response (Th2) measured by the anti-PGL-I ELISA demonstrated seropositivity of 44.7% (21/47) among contacts that developed the disease versus 11.8% (285/2414) among those who remained healthy during follow-up, indicating a 5-fold RR increase for disease outcome (RR, 5.688; 95% CI, 3.2412-9.9824).

Comparing the data obtained from healthy contacts with the data of affected contacts allowed the analysis of the combined association effects of BCG immunization, anti-PGL-I serology, and cell-mediated hypersensitive responses to heat-killed *M. leprae* with the disease outcome. The risk ratios demonstrated an increased effect towards the onset of disease when a combination of the three assays (BCG scar/Mitsuda test/anti-PGL-I ELISA) was established (**Figure 1C**). Positive results for both BCG and the Mitsuda test conferred 50% relative risk reduction (RR, 0.4709; 95% CI, 0.2500-0.8872), while the combination of the unfavorable results for the three assays (no BCG scar, Mitsuda reaction <7 mm, and seropositivity to anti-PGL-I) conferred an 8-fold greater risk for the disease onset (RR, 8.1090; 95% CI, 5.1167-12.8511).

DISCUSSION

Epidemiological studies in endemic settings are important for assessing the long-term risk and protective factors that may help to prevent the development of a disease. This study reinforces that anti-PGL-I serology, the Mitsuda test, and the BCG vaccination are tools of paramount value in the long-term strategy for further reducing the disease burden due to leprosy.

This study adds evidence and data to observations reported previously by our research group after monitoring the HHCs for five years⁽¹⁴⁾. The maintenance of the new case detection rate at around 2% among the HHCs indicates the low pathogenicity of *M. leprae*. Despite exposure, 98% of HHCs are not affected by the disease, particularly in this endemic region.

The majority of new cases among HHCs occurred during the first year of follow-up, including 28 co-prevalent cases that were diagnosed along with their index cases. This indicates not only that the first examination is important but also that there should be close monitoring during the first year.

TABLE 1 - Household contacts profile.

Variable	Variables	Co-prevalent		Diagnosed contacts		Healthy contacts	
		n	%	n	%	n	%
Sex	male	8	28.6	23	48.9	1,262	43.3
	female	20	71.4	24	51.1	1,655	56.7
Age group	0-14	6	21.4	4	8.5	889	30.5
	15-30	5	17.8	12	25.5	806	27.6
	31-45	8	28.6	13	27.6	607	20.8
	46-60	6	21.4	10	21.3	389	13.3
	>60	3	10.7	8	17.0	226	7.7
	Total	28	0.9	47	1.6	2,917	97.5
Clinical/operational classification of the index case	I	0	0	0	0	24	0.8
	TT/PB	2	7.1	2	4.2	212	7.5
	BT/PB	6	21.4	2	4.2	432	15.3
	BT/MB	1	3.6	5	10.6	464	16.4
	BB/MB	4	14.3	4	8.5	468	16.5
	BL/MB	2	7.1	4	8.5	519	18.3
	LL/MB	13	46.4	30	63.8	711	25.1
	Total	28	1.0	47	1.6	2,830*	97.4
Mitsuda test ^a	negative	18	66.7	38	86.4	1,561	62.7
	positive	9	33.4	6	13.6	929	37.3
Total	27**	1.1	44**	1.7	2,490**	97.2	
anti-PGL-I ELISA ^b	negative	10	35.7	21	44.7	2,129	88.2
	positive	18	64.3	26	55.3	285	11.8
Total	28	1.1	47	1.9	2,414***	97.0	
BCG scars ^c	negative	14	50.0	25	53.2	709	24.5
	positive	14	50.0	22	46.8	2,180	75.5
Total	28	0.9	47	1.6	2,889****	97.5	

I: Indeterminate leprosy; TT: tuberculoid; PB: paucibacillary; BT: borderline-tuberculoid; MB: multibacillary; BB: mid-borderline; BL: borderline-lepromatous; LL: lepromatous; PGL-I: phenolic glycolipid I; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; BCG: Bacillus Calmette-Guérin vaccine. CREDESH/UFU: National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy/Universidade Federal de Uberlândia. *excluded 87 due to incomplete data; **excluded 431 due to comorbidities or treatments that interfered with results; ***excluded 503 due to incomplete data or inconclusive results; ****excluded 28 due to incomplete data. ^aMitsuda test: considered positive when induration was >7 mm; ^banti-PGL-I ELISA: considered positive when the ELISA index was ≥1.1; ^cBCG scars: considered positive when there was at least one scar from the BCG vaccine. **Note:** Household contacts by sex, age (N = 2,992), clinical and operational classification of the index case (N = 2,905), Mitsuda test (N = 2,561), anti-PGL-I ELISA (N = 2,489), and presence of BCG scars (N = 2,964). CREDESH/UFU, Brazil, 2013.

On the other hand, we also observed that individuals developed the disease during every year of follow-up, up to the seventh year. Predominantly, the age of affected contacts was between 31 and 45 years. As a chronic disease with a long period of incubation and a common delay reported by new cases between the first symptoms and the diagnosis, the age-specific risk is difficult to assess, especially if occurrence is associated with age at detection rather than with the age at disease onset⁽¹⁷⁾.

As expected, most HHCs that were affected by the disease were contacts of MB index cases. This finding increases the evidence to support closer monitoring of HHCs of MB index cases by the control programs in endemic regions. However, it is noteworthy that the predominant form of illness observed among the HHCs was the PB type of leprosy, with BT clinical manifestations, which are immunologically unstable⁽¹³⁾.

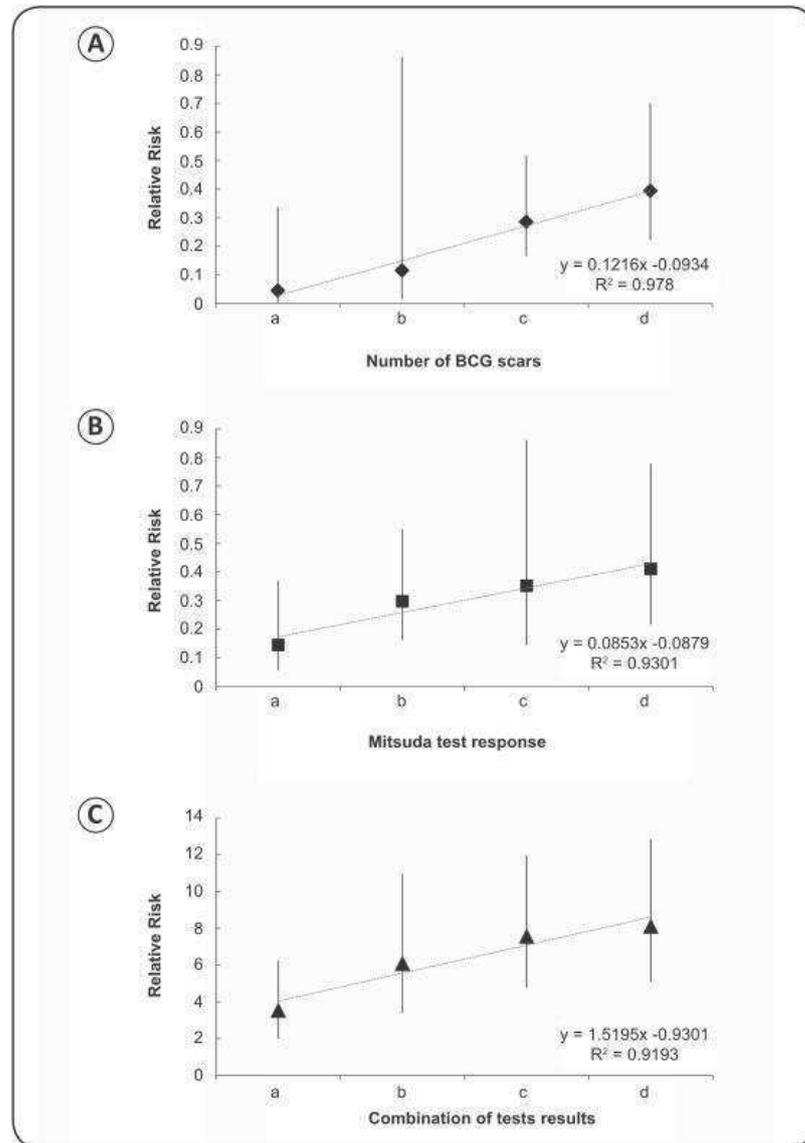


FIGURE 1 - Analysis of the relative risk with 95% confidence intervals for BCG vaccination, Mitsuda test, and anti-PGL-I serology results observed in healthy household contacts of leprosy patients and in those who developed the disease during follow-up:

A. Number of BCG scars: a. two or more scars versus (vs) no scar (RR, 0.0459; 95%CI, 0.006-0.338); b. two or more scars vs 1 scar (RR, 0.1162; 95% CI, 0.0157-0.8622); c. one or more scar vs no scar (RR, 0.2862; 95%CI, 0.1664-0.5170); d. one scar vs no scar (RR, 0.3947; 95% CI, 0.2224-0.7004).

B. Mitsuda late-hypersensitivity test: a. induration greater than (>) 7mm vs less than (<) 4mm (RR, 0.1446; 95% CI, 0.0566-0.3696); b. \geq 4mm vs <4mm (RR, 0.2976; 95% CI, 0.1612-0.5492); c. \geq 7mm vs 4-7mm (RR, 0.3518; 95% CI, 0.1438-0.8606); d. 4-7mm vs <4mm (RR, 0.4110; 95% CI, 0.2169-0.7789).

C. Combined results for BCG vaccination, Mitsuda test, and anti-PGL-I serology: a. no BCG scar and Mitsuda <7mm vs all other combination of results (RR, 3.5369; 95% CI, 1.9946-6.2540); b. Mitsuda <7mm and seropositivity (+) to anti-PGL-I vs all other combinations (RR, 6.0895; 95% CI, 3.3844-10.9567); c. no BCG scar and + to anti-PGL-I vs all other combinations (RR, 7.5684; 95% CI, 4.7892-11.9603); d. no BCG scar, Mitsuda <7mm, and + to anti-PGL-I vs all other combinations (RR, 8.109; 95% CI, 5.1167-12.8511).

BCG: Bacillus Calmette-Guérin; **anti-PGL-I:** anti-phenolic glycolipid I; **RR:** relative risk; **95% CI:** 95% confidence intervals.

The control strategy during the 10 years of this study comprised trained health personnel capable of early leprosy diagnosis and HHC monitoring along with routine BCG immunization and Mitsuda testing. Notwithstanding, those truly susceptible became affected, and regardless of the presumed widespread and continuous exposure of the HHC group, 98% of them did not develop disease.

The BCG vaccination has been thought to be a prevention strategy against leprosy since the 1960s⁹⁾, and its great importance as an epidemiological and clinical tool is undeniable. Hence, it is clear that an additional immunization with BCG for HHCs of leprosy patients should be recommended to boost their protection.

That the majority of the new cases were detected among individuals without BCG scars and that they were diagnosed during the first year of follow-up (both of which occurred after inoculation with live BCG and heat-killed *M. leprae*) raised the hypothesis that the signs and symptoms of the disease were exacerbated after the immune defenses were boosted, either by BCG or the Mitsuda test, reducing the time for diagnosis and initiation of treatment, and thus the severity of disease.

This survey corroborates with others, indicating that elevated titers of circulating IgM anti-PGL-I are associated with the increased risk for disease onset and that there is a susceptibility linked to immediate contact with MB patients⁽¹⁾⁽⁶⁾⁽¹⁵⁾. Although they were susceptible, most HHCs that were diagnosed presented less severe clinical manifestations and reduced bacillary burden, suggesting that monitoring contacts effectively improved diagnosis, and also that early cases, even the MB types, exhibit initially subtle signs and symptoms. The initiation of treatment at early stages of the disease prevents nerve damage and incapacitating consequences.

In this extensive analysis over a longer period of time, we reinforced our previous results, which demonstrated that the combination of BCG immunization, the Mitsuda test, and anti-PGL-I detection is critical for an active control program and can reduce the severity of the disease, especially regarding HHCs of leprosy patients.

The adoption of these combined assays may impose measures for post-exposure prophylaxis of those at higher risk, i.e., close contacts of newly diagnosed cases. At first, the immediate contacts of every new case should receive immunoprophylaxis, or in some cases, an additional booster of intradermal BCG. Also, serological screening should identify anti-PGL-I seropositive individuals with sub-clinical or asymptomatic leprosy. These individuals should be examined by physicians and followed to confirm if they will or will not develop the disease. To enhance the effectiveness of leprosy control strategies, we suggest that along with these actions, chemoprophylaxis should be administered to all healthy contacts.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the commitment of the staff of the National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH) in providing outstanding patient care for the individuals involved in this research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This study was financially supported with grants from: Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais [Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)], Brazilian National Council for Scientific and Technological Development [Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)], Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel [Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)], and by the National Fund for Health/Brazilian Ministry of Health.

REFERENCES

1. World Health Organization (WHO). World Health Assembly (WHA) resolution to eliminate leprosy. Geneva, Switzerland: WHO; 1991.
2. World Health Organization (WHO). Global leprosy update, 2014: need for early case detection. *Wkly Epidemiol Rec* 2014; 36: 461-476.
3. Goulart IM, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* 2008; 300:269-290.
4. Schuring RP, Richardus JH, Pahan D, Oskam L. Protective effect of the combination BCG vaccination and rifampicin prophylaxis in leprosy prevention. *Vaccine* 2009; 27:7125-7128.
5. Goulart LR, Goulart IMB. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Arch Dermatol Res* 2009; 301:123-137.
6. Araujo S, Lobato J, Reis EM, Souza DO, Gonçalves MA, Costa AV, et al. Unveiling health carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107 (supl 1):55-59.
7. Abubakar I, Pimpin L, Ariti C, Beynon R, Mangtani P, Sterne JA, et al. Systematic review and meta-analysis of the current evidence on the duration of protection by bacillus Calmette-Guérin vaccination against tuberculosis. *Health Technol Assess* 2013; 17:1-372.
8. Han XY, Silva FJ. On the age of leprosy. *Plos Negl Trop Dis* 2014; 8:e2544.
9. Yanagisawa K. On the immunological relationship between tuberculosis and leprosy with special reference to the effect of BCG administration upon the prophylaxis of Leprosy. *La Leprosy* 1960; 26:37-47.
10. Gillis TP, Tullius MV, Horwitz MA. rBCG30-induced immunity and cross-protection against *Mycobacterium leprae* challenge are enhanced by boosting with the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kilodalton antigen 85B. *Infect Immun* 2014; 82:3900-3909.
11. Ministério da Saúde. Manual de normas e procedimentos para vacinação. Brasília, Brasil: Ministério da Saúde; 2014.
12. Pereira SM, Dourado I, Barreto ML, Cunha SS, Ichihara MY, Hijjar MA, et al. Sensitivity and specificity of BCG scar reading in Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5:1067-1070.

13. Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. Rev Soc Bras Med Trop 2002; 35:365-375.
14. Goulart IMB, Souza DOB, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. Clin Vaccine Immunol 2008; 15:101-105.
15. Reis EM, Araújo S, Lobato J, Neves AF, Costa AV, Gonçalves MA, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. Clin Microbiol Infect 2014; 20:447-452.
16. Lobato J, Costa MP, Reis EM, Gonçalves MA, Spencer JS, Brennan PJ, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. Lepr Rev 2011; 82:389-401.
17. Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, editor. Leprosy. 1st ed. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone; 1985. p. 15-30.

Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission

Isabela Maria Bernardes Goulart,^{a,b} Sergio Araujo,^{a,b*} Adilson Botelho,^c Paulo Henrique Ribeiro de Paiva,^c Luiz Ricardo Goulart^{a,b,d}

National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy, Clinics Hospital, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^a; Postgraduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^b; Regional Blood Bank of Uberlandia, Hemominas Foundation, Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^c; Institute of Biochemistry and Genetics, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil^d

Blood donor samples (1,007) were assessed for anti-phenolic glycolipid 1 (PGL-1) IgM antibodies and *Mycobacterium leprae* DNA presence, which had 3.8% and 0.3% positivity, respectively. After a 5-year follow-up period, six individuals with positive markers developed leprosy, raising the hypothesis that asymptomatic infection among blood donors may be an undisclosed mode of leprosy transmission via transfusion.

Leprosy is one of the oldest infectious diseases known to affect humans and remains a public health issue, particularly in Brazil, which accounts for almost all new cases detected in the Americas (1).

Untreated leprosy patients are considered the main source of transmission. However, the dichotomy between the highly effective treatment and the occurrence of new cases among people without previous contact with patients indicates that other infectious sources must be investigated (2).

The majority of exposed individuals will not develop the disease, although cumulative evidence demonstrates widespread dissemination of bacilli in regions where leprosy is endemic, strengthening the hypothesis that asymptomatic individuals are involved in the *Mycobacterium leprae* chain of transmission (3).

Serological reactivity to *M. leprae* antigens has been used as an immunological marker for exposure and infection (4). Seropositivity for antibodies against phenolic glycolipid 1 (PGL-1), *M. leprae*-specific cell surface antigenic molecule has been correlated to a greater chance for later onset of leprosy among household contacts of leprosy patients (5).

Studies regarding the detection of *M. leprae* DNA in peripheral blood samples are scarce. It has recently been suggested that whole-blood nested-PCR amplification could be used for early diagnosis of leprosy (6) and that the presence of *M. leprae* DNA in peripheral blood may be associated with bacillary migration and a high risk for disease onset (7).

There are no published data on the assessment of randomly selected healthy blood donors for any kind of *M. leprae* marker. Therefore, this is the first epidemiological study to assess donor blood samples for the presence of antibodies against *M. leprae* and bacillary DNA through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real-time PCR, respectively.

Subjects were screened from a population of 1,035 blood donors at the regional blood bank of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. All subjects had normal dermatoneurological clinical examinations, and 28 people who reported prior contact with leprosy patients were excluded from the study. The reported new-case detection rate in the Uberlandia region was 11 per 100,000 population.

A total of 1,007 peripheral blood samples were assessed for the presence of anti-PGL-1 antibodies and *M. leprae* DNA. Indirect

ELISA against *M. leprae* native PGL-1 molecule was applied to detect specific IgM antibodies in serum samples, according to previously described methodology (4). Detection of DNA was performed with a species-specific TaqMan primer/probe assay targeting the repetitive region RLEP element of dispersed repeats in the *M. leprae* genome, as previously described (8).

For specificity analysis, DNA templates from microbial cultures and clinical samples (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. goodii*, *M. fortuitum*, *M. avium*, *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Paracoccidioides brasiliensis*, and newborn human blood) were evaluated for PCR cross-reactions. Basic Local Alignment Search Tool (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) was employed to confirm that primers were *M. leprae* specific. A sample with a known concentration of *M. leprae* DNA and amplification of human NRAMP1 (*Homo sapiens* solute carrier family 11 member 1, SLC11A1 [NG_012128.1]) gene was used as the PCR positive control. In order to avoid false-positive results, positive samples from healthy donors were confirmed using a second primer set targeting another *M. leprae*-specific fragment of 130 bp in the repetitive region RLEP3, as previously described (9). No cross-reactivity was observed with any other organism assessed, and BLAST results for the PCR primers confirmed species-specific alignment to only the *M. leprae* genome.

Thirty-eight individuals (3.8%) presented positive results for

Received 22 May 2015 Returned for modification 28 June 2015

Accepted 16 July 2015

Accepted manuscript posted online 22 July 2015

Citation Goulart IMB, Araujo S, Botelho A, Filho, de Paiva PHR, Goulart LR. 2015. Asymptomatic leprosy infection among blood donors may predict disease development and suggests a potential mode of transmission. *J Clin Microbiol* 53:000–000. doi:10.1128/JCM.01305-15. Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. doi:10.1128/JCM.01305-15

TABLE 1 Anti-PGL-1 serology (ELISA) and *Mycobacterium leprae* DNA detection (PCR) in 41 blood donors who presented positive markers in 2009 and were followed up for at least 5 years (2009 to 2014)

Donor no.	ELISA follow-up (yearly)					PCR (blood)	PCR slit-skin smear ^a	Mitsuda test ^f (mm)	Disease onset (clinical manifestation ^b)
	2009	2010	2011	2012	2013	2009			
01	+	+	-	-	-	-	-	8	No
02	+	-	-	-	ND ^d	-	ND	9	No
03	+	+	+	+	+ ^e	-	+	7	Yes (I)
04	+	+	+	+	+ ^e	-	+	10	Yes (T)
05 ^c	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	No
06	+	ND	ND	ND	+	-	-	10	No
07	+	+	+	-	-	-	-	10	No
08	+	ND	-	-	-	-	ND	8	No
09	+	+	ND	ND	ND	-	-	5	No
10	+	+	+	+	+	-	-	5	No
11	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	4	No
12	+	+	+	+	-	-	-	5	No
13	+	+	+	+	+	-	-	7	No
14	+	ND	ND	ND	-	-	ND	12	No
15	+	ND	ND	ND	-	-	ND	0	No
16	+	+	-	-	-	-	-	7	No
17	+	-	-	ND	ND	-	ND	8	No
18 ^c	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	No
19	+	ND	ND	ND	+	-	-	7	N
20	+	+	+	+	+ ^e	-	+	11	Yes (BT)
21	+	+	+	+	+	-	-	9	N
22	+	+	+	+	+	-	-	9	No
23	+	-	+	-	+	-	-	7	No
24 ^c	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	No
25	+	+	-	+	+	-	-	10	No
26	+	ND	ND	+	+	-	-	10	No
27	+	ND	ND	-	-	-	ND	9	No
28	+	+	+	+	+	-	-	10	No
29 ^c	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	No
30	+	+	+	-	+	-	-	9	No
31	+	ND	ND	ND	ND	-	-	0	No
32	+	-	+	-	-	-	-	8	No
33	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	13	No
34	+	+	+	+	+ ^e	-	+	6	Yes (BT)
35	+	+	+	+	+ ^e	-	+	0	Yes (BT)
36 ^c	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	No
37	+	-	-	-	-	-	ND	10	No
38	+	ND	ND	ND	ND	-	ND	10	No
39	-	-	-	-	+ ^e	+	+	13	Yes (I)
40	-	-	-	-	-	+	ND	9	No
41 ^c	-	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	No

^a Criteria for PCR in slit-skin smears: PCR was performed in individuals positive for both ELISA and PCR or with two positive ELISA results.

^b Clinical manifestation: T, tuberculoid leprosy; BT, borderline-tuberculoid leprosy; I, indeterminate leprosy.

^c Blood donors who did not return for analysis.

^d ND, test not done due to participant's decision.

^e Disease onset.

^f The Mitsuda test involves an intradermal injection of a heat-killed *M. leprae* suspension. As the cell-mediated immunity is closely related to the clinical manifestation of leprosy, the response elicited against *M. leprae* antigens can be visually observed 28 days later by the formation of a nodular epithelioid granuloma at the site of injection. Multifibillary (MB) patients often do not show any reaction, and at the opposite end of the spectrum, paucibacillary (PB) patients usually display strong positive reaction. For healthy individuals, a positive response to the Mitsuda test is associated with greater chance of protection against disease.

anti-PGL-1 ELISA, and PCR positivity among blood donors was 0.3% (3/1,007). Individuals with positive results were informed that they did not have the disease, but they were invited to participate in a 5-year follow-up, with collection of new samples and a clinical dermatoneurological examination at least once a year. The confirmed positive blood units were not used for transfusions and

were discarded. When participants presented more than one positive result during follow-up, they underwent slit-skin smear sampling for *M. leprae* detection.

Five out of nine donors that were continuously seropositive for anti-PGL-1 and one with a positive PCR that became seropositive developed leprosy during follow-up (6/41 [14.6%]), but only one

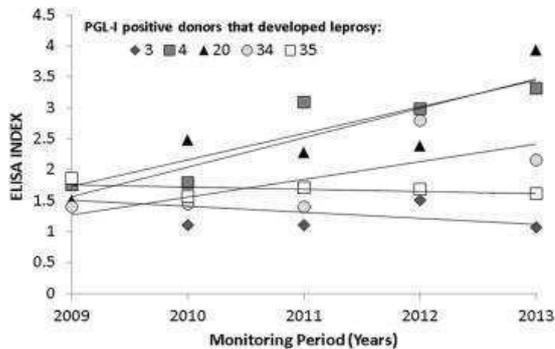


FIG 1 Anti-PGL-1 serology (ELISA index [EI]) behavior during follow-up of 5 blood donors who developed leprosy and presented seropositivity in 2009. The antibody titers were expressed as the EI according to the following formula: $EI = OD_{sample} / OD_{cutoff}$, where OD is optical density, as described previously (4). EI values of >1.1 were considered positive.

was positive for both tests during follow-up (Table 1). Out of the five individuals who initially presented positivity to anti-PGL-1 and later became ill, two showed little variation in the anti-PGL-1 titers throughout the follow-up, while three tended to increase the ELISA titration (Fig. 1). These six new cases were subjected to other confirmatory tests and presented positivity for *M. leprae* DNA in slit-skin smears and skin biopsy specimens, providing strong evidence that subclinical infection progressed to disease. Four out of the six new cases presented abnormalities in electro-neuromyography that indicated sensory nerve damage, leading to the clinical classification tuberculoid leprosy (T) (1) or borderline-tuberculoid leprosy (BT) (3), and two did not present any abnormalities and were classified indeterminate (I).

During the 5-year follow-up period, we performed an extensive search in the database of the notified cases of leprosy in Brazil (National System of Diseases Notifications, Ministry of Health) for donors who presented negative results in the initial evaluation. We identified only one donor who was diagnosed with leprosy among those with negative results (1/966 [0.1%]).

The test performance results for the ELISA anti-PGL-1 were sensitivity of 0.83 (95% confidence interval [CI], 0.36 to 0.97), specificity of 0.97 (95% CI, 0.95 to 0.98), positive likelihood ratio of 25.20 (95% CI, 15.43 to 41.16), and odds ratio of 146.21 (95% CI, 16.61 to 1,286.9; $P < 0.0001$). The test performance results for PCR in blood samples were sensitivity of 0.5 (95% CI, 0.08 to 0.91), specificity of 0.998 (95% CI, 0.993 to 0.999), positive likelihood ratio of 242.0 (95% CI, 34.12 to 1,716.3), and odds ratio of 482.5 (95% CI, 21.74 to 10,707.02; $P < 0.0001$).

The seropositivity observed in our study was slightly higher than that observed in a recent study sampling healthy controls (1/35), which assessed serum samples for antibodies against a PGL-1 synthetic antigen (ND-O-BSA) (6). It is important to emphasize that the case detection rate in the Uberlandia region was 10-fold higher than that in Yunnan province, and the absolute number of new leprosy cases detected in Brazil was 30-fold higher than the number detected in China (1). Additionally, our blood donor population was more representative and does not present any specific subgroups, such as health care professionals or food handlers (6). Discrepancies may also be the result of our larger

sampling. The same study did not report PCR positive results among the healthy controls, although household contacts presented a PCR positivity of 6.25% (6/96) (6). Not surprising, in addition to living in the same dwelling, household contacts often share similar conditions of nutrition, social status, hygiene, and, in some cases, consanguinity.

Compared with the prevalence of other diseases with mandatory notification at blood centers, our findings presented rates similar to those observed for hepatitis C virus (HCV) and hepatitis B virus (HBV) and higher than the rates observed for human immunodeficiency virus (HIV) and Chagas disease (10).

Blood donors are usually individuals with above-average health, and, as expected, most of those exposed to *M. leprae* do not develop disease. Once *M. leprae* has successfully entered the bloodstream and before the appearance of leprosy signs or symptoms, it remains a subclinical infection, which can spontaneously heal or progress to disease. In this period, it is plausible that these healthy carriers play a role in the chain of transmission and contribute to the maintenance of bacillary burden in regions where leprosy is endemic (3).

Potentially infective viable bacilli have been isolated from peripheral blood samples of untreated leprosy patients (11), and our findings draw attention to the potential transmission of bacilli via transfusions. Although probably uncommon, blood transmission should be considered, particularly when considering that transfusion recipients are almost always hospitalized individuals who require great care and are vulnerable to infections.

There are no reports of *M. leprae* blood transmission, but there are several reports of leprosy manifestation in individuals after they have undergone organ transplantation (12–18). However, these studies did not investigate the origin and quality of the blood received by these patients during the surgical procedure nor the origin of the transplanted organs, i.e., whether the donors were from regions where leprosy is endemic.

Our findings emphasize the importance of serological and DNA-based techniques for the assessment and confirmation of diagnosis in suspected and early cases of leprosy. The anti-PGL-1 detection was the trigger for the investigation of skin smear samples for the presence of *M. leprae* DNA by PCR. This has led to early diagnosis and treatment, thus preventing nerve damage and interrupting the transmission. Diagnosis was determined by a committee of medical specialists for leprosy based on clinical and laboratory evaluations.

We advise that in countries where leprosy remains a public health problem, these tests be performed in the screening of all samples collected at blood banks, particularly in regions where the disease is highly endemic. The success of a leprosy control program must be supported by prevention, early diagnosis, treatment, and interruption of transmission. Hence, we underscore our previous recommendation for the adoption of chemoprophylaxis as a disease prevention strategy and to promote clearance of bacilli in close contacts of leprosy patients and in those with asymptomatic infection, consequently disrupting transmission of the disease (3, 5, 7).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the staffs of the National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy and the Hemominas – Regional Blood Bank of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

This study was supported by grants from the Foundation for Research

Goulart et al.

Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and National Fund for Health/Brazilian Ministry of Health.

We declare that we have no conflicts of interest.

The research protocol was approved by two independent research ethics committees at the Federal University of Uberlandia (261/05) and the Hemominas Foundation (127/05). All participants were informed about the research, voluntarily agreed to take part in this study without any financial incentive, and signed consent forms. Individuals had the right to refuse or stop participation at any time without explanation.

I.M.B.G., S.A., and L.R.G. conceived and designed the study. A.B. and P.H.R.D.P. implemented the study and carried out the clinical assessment. I.M.B.G., S.A., and L.R.G. carried out the analysis, data interpretation, and writing of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. WHO. 2014. Global leprosy update, 2013: reducing disease burden. *Wkly Epidemiol Rec* 89:389–400.
2. Matsuoka M, Zhang L, Budiawan T, Saeki K, Izumi S. 2004. Genotyping of *Mycobacterium leprae* on the basis of the polymorphism of TTC repeats for analysis of leprosy transmission. *J Clin Microbiol* 42:741–745. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.2.741-745.2004>.
3. Araujo S, Lobato J, Reis Ede M, Souza DO, Goncalves MA, Costa AV, Goulart LR, Goulart IMB. 2012. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107(Suppl 1):55–59. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000900010>.
4. Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, Goncalves MA, Spencer JS, Brennan PJ, Goulart LR, Goulart IMB. 2011. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev* 82:389–401.
5. Goulart IMB, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimentá VL, Goncalves MA, Goulart LR. 2008. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clin Vaccine Immunol* 15:101–105. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00372-07>.
6. Wen Y, Xing Y, Yuan LC, Liu J, Zhang Y, Li HY. 2013. Whole-blood nested-PCR amplification of *M. leprae*-specific DNA for early diagnosis of leprosy. *Am J Trop Med Hyg* 88:918–922. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.11-0253>.
7. Reis EM, Araujo S, Lobato J, Neves AF, Costa AV, Goncalves MA, Goulart LR, Goulart IMB. 2014. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clin Microbiol Infect* 20:447–452. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12349>.
8. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. 2008. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e328. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328>.
9. Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, Goncalves MA, Pereira JE, Goulart LR. 2007. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res* 299:267–271. <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-007-0758-5>.
10. Borelli SD, Mazzola JC, Matta AC, Takemoto AY, Bertoli M. 2013. Blood discard rate and the prevalence of infectious and contagious diseases in blood donors from provincial towns of the state of Parana, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 35:395–399. <http://dx.doi.org/10.5581/1516-8484.20130126>.
11. Lane JE, Balagon MV, Dela Cruz EC, Abalos RM, Tan EV, Cellona RV, Sadaya PG, Walsh GP, Walsh DS. 2006. *Mycobacterium leprae* in untreated lepromatous leprosy: more than skin deep. *Clin Exp Dermatol* 31:469–470. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2230.2006.02075.x>.
12. Modi K, Mancini M, Joyce MP. 2003. Lepromatous leprosy in a heart transplant recipient. *Am J Transplant* 3:1600–1603. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1600-6135.2003.00284.x>.
13. Launius BK, Brown PA, Cush E, Mancini MC. 2004. A case study in Hansen's disease acquired after heart transplant. *Crit Care Nurs Q* 27:87–91. <http://dx.doi.org/10.1097/00002727-200401000-00008>.
14. Shih HC, Hung TW, Lian JD, Tsao SM, Hsieh NK, Yang JH. 2005. Leprosy in a renal transplant recipient: a case report and literature review. *J Dermatol* 32:661–666. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1346-8138.2005.tb00818.x>.
15. Gasink LB, Seymour C, Blumberg EA, Goldberg LR, Fishman NO. 2006. An uncommon presentation of an uncommon disease: leprosy in a heart transplant recipient. *J Heart Lung Transplant* 25:854–856. <http://dx.doi.org/10.1016/j.healun.2006.03.016>.
16. Guditi S, Ram R, Ismal KM, Sahay M, Dakshinamurthy KV, Girish N, Prasad N. 2009. Leprosy in a renal transplant recipient: review of the literature. *Transpl Infect Dis* 11:557–562. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2009.00428.x>.
17. Trindade MA, Palermo ML, Pagliari C, Valente N, Naafs B, Massarollo PC, D'Albuquerque LA, Benard G. 2011. Leprosy in transplant recipients: report of a case after liver transplantation and review of the literature. *Transpl Infect Dis* 13:63–69. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3062.2010.00549.x>.
18. Ardalan M, Ghaffari A, Ghabili K, Shoja MM. 2011. Lepromatous leprosy in a kidney transplant recipient: a case report. *Exp Clin Transplant* 9:203–206.

ANEXO D – ARTIGO: REIS ET AL 2014.

ORIGINAL ARTICLE

10.1111/1469-0691.12349

***Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset**

E. M. Reis^{1,2}, S. Araujo^{1,2}, J. Lobato^{1,3}, A. F. Neves⁴, A. V. Costa¹, M. A. Gonçalves¹, L. R. Goulart^{5,6} and I. M. B. Goulart^{1,2}

1) National Reference Centre for Sanitary Dermatology and Leprosy, Clinic Hospital, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, 2) Post-Graduation Programme in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, 3) Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, 4) Federal University of Goias, Catalao, GO, 5) Institute of Biochemistry and Genetics, Federal University of Uberlandia, Uberlandia, MG, Brazil and 6) Department of Medical Microbiology and Immunology, Genome and Biomedical Sciences Facility, University of California, Davis, CA, USA

Abstract

Leprosy epidemiological studies have been restricted to *Mycobacterium leprae* DNA detection in nasal and oral mucosa samples with scarce literature on peripheral blood. We present the largest study applying quantitative real-time PCR (qPCR) for the detection of *M. leprae* DNA in peripheral blood samples of 200 untreated leprosy patients and 826 household contacts, with results associated with clinical and laboratory parameters. To detect *M. leprae* DNA a TaqMan qPCR assay targeting the *M. leprae* ML0024 genomic region was performed. The ML0024 qPCR in blood samples detected the presence of bacillus DNA in 22.0% (44/200) of the leprosy patients: 23.2% (16/69) in paucibacillary (PB), and 21.4% (28/131) in multibacillary (MB) patients. Overall positivity among contacts was 1.2% (10/826), with similar percentages regardless of whether the index case was PB or MB. After a follow-up period of 7 years, 26 contacts have developed leprosy. Comparing the results of healthy contacts with those that become ill, ML0024 qPCR positivity at the time of diagnosis of their index case represented an impressive 14.78-fold greater risk for leprosy onset (95% CI 3.6–60.8; $p < 0.0001$). In brief, contacts with positive PCR in blood at diagnosis of index cases are at higher risk of later leprosy onset and this marker might be combined with other prognostic markers for management of contacts, which requires further studies.

Keywords: Blood-borne pathogens, epidemiology, leprosy, *Mycobacterium leprae*, real-time PCR

Original Submission: 29 May 2013; **Revised Submission:** 20 July 2013; **Accepted:** 24 July 2013

Editor: E. Bottieau

Clin Microbiol Infect

Corresponding author: S. Araujo, Laboratory of Molecular Pathology and Biotechnology of CREDESH, Campus Umarama – UFU, Bl. 6T, Room 05, Av. Amazonas, s/n, Uberlandia/MG Brazil
E-mail: sergioxwide@hotmail.com

Introduction

Leprosy is a complex disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate intracellular pathogen with tropism for Schwann cells and cells of the mononuclear phagocyte system. The disease has a wide variety of clinical presentations which are classified into a spectrum of clinical forms according to the patient's immunological status: two polar forms, tuberculoid

(TT) and lepromatous (LL) leprosy, and three unstable borderline groups: borderline-tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB) and borderline-lepromatous (BL) [1]. The tuberculoid side of the spectrum (TT and BT leprosy) is characterized by vigorous cell-mediated immune response, well-defined skin and nerve lesions, and few bacilli (paucibacillary leprosy, PB). Across the five-group system, the host presents gradual reduction of cell-mediated immune responses towards the lepromatous side of the spectrum (BL and LL), associated with increased bacillary load, several skin and nerve lesions, and high antibody titres (multibacillary leprosy, MB) [2].

Untreated MB patients are considered the main source of *M. leprae* transmission [3,4]. However, the number of MB patients is small and cannot represent the sole source of infection. Currently, the possibility of bacilli spread is not

restricted to leprosy patients, healthy carriers and individuals with subclinical infections, i.e. household contacts who carry *M. leprae* in their nasal [4–7] and/or oral mucosa [8], may play an important role in the disease chain of transmission.

Detection of *M. leprae* DNA by conventional PCR has achieved significant sensitivity and specificity when compared with conventional bacilli staining techniques [9–11]. However, quantitative real-time PCR (qPCR) has displayed even higher sensitivity and specificity in diagnosis of several parasites, and has been successfully applied to detect *M. leprae* DNA, mainly in skin smears and biopsy samples [8,12,13].

Clinical signs of leprosy are most commonly observed in the skin and peripheral nerves, but it is suggested that bacteraemia may occur at some point during disease progression [14]. The presence of *M. leprae* in peripheral blood has not been thoroughly investigated, although some reports have shown an infrequent presence of *M. leprae* in the blood of leprosy patients using both staining techniques [14] and conventional PCR [3]. At this time there are no publications on the qPCR detection of *M. leprae* DNA in peripheral blood samples.

It is necessary to define if besides indicating subclinical infection, *M. leprae* DNA in blood may represent a risk factor for leprosy development in these individuals. This study aims to evaluate the presence of *M. leprae* DNA in peripheral blood samples of leprosy patients and their household contacts.

Materials and Methods

Assays were performed in peripheral blood samples of 200 untreated leprosy patients and 826 household contacts attending the National Reference Centre for Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH), MG, Brazil. Research protocol was approved by an independent research ethics committee and participants signed an informed consent form.

Study subjects

All leprosy patients were diagnosed by a committee of leprosy experts based on clinical and laboratory tests and were classified according to the Ridley–Jopling clinical forms five-group system (TT, BT, BB, BL, LL). For treatment purposes, all patients also received an operational classification into PB or MB [2].

Blood samples were collected from all patients at diagnosis and all underwent Mitsuda test, an intradermal injection of 0.1 mL of a heat-killed *M. leprae* suspension of 6×10^7 bacilli/mL produced by the Lauro de Souza Lima Institute (ILSL-SP), with results observed 28 days later and stratified

according to the measurement in millimetres of the nodular epithelioid granuloma diameter: negative (0–3 mm), weakly positive (4–7 mm), positive (8–10 mm), strongly positive (>10 mm or of any size with ulceration); bacillary index in skin smears and bacillary index in skin lesion biopsies, with positive results when any bacilli were observed and negative when none were found; and anti-phenolic glycolipid-I (PGL-I) ELISA, an indirect ELISA to detect antibodies against the *M. leprae* native PGL-I molecule (donated by Dr John Spencer, Colorado State University, CO, USA), performed with a protocol standardized and previously described by our research group [15].

The CREDESH database holds records of 3113 contacts enrolled in the period from 2002 to 2012. A follow-up period of 7 years was established as sampling criterion and only contacts with a complete set of clinical and laboratory parameters were included, totalling 826 contacts.

These 826 household contacts were stratified according to clinical forms and operational classification of their index case. All the contacts were examined by specialist leprosy physicians for signs or symptoms that were suggestive of leprosy and all displayed normal dermato-neurological clinical examinations. Blood samples were collected from all contacts at diagnosis of their index case and they also underwent Mitsuda test and anti-PGL-I ELISA. Contacts were further stratified into two classes: affected (those who develop leprosy) and healthy (those without any sign or symptom). Table 1 summarizes these assessments of leprosy patients and household contacts.

DNA extraction and qPCR

DNA from 500 μ L peripheral blood was extracted with phenol and precipitated with ethanol. At the end, the DNA pellet was dried at room temperature and suspended in 50 μ L ultrapure water.

A region of 69 bp from a unique *M. leprae* genomic region (Gene: *ML0024*—GenBank Accession no. AL583917) was amplified, detected and quantified using a TaqMan primer/probe assay as previously described [8].

Statistical analysis

Differences between the groups were assessed by chi-squared or Student's *t*-test, when appropriate. The kappa test was applied to evaluate the agreement between the *ML0024* qPCR and other tests. Pearson's linear correlation test was employed to assess the correlation between *ML0024* qPCR and other tests. The OR and positive likelihood ratio were calculated to evaluate the performance of tests and estimate the probabilities for later leprosy onset. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

TABLE 1. Laboratory tests results according to clinical forms and operational classification of leprosy patients and index cases of household contacts

Patients (n = 200)													
Operational classification and clinical form													
PB (n = 69)						MB (n = 131)							
TT (n = 25)			BT (n = 44)			BT (n = 34)		BB (n = 34)		BL (n = 30)		LL (n = 33)	
Laboratory tests	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
BI in skin biopsies positivity	1	4	8	18.2	19	55.9	23	67.7	28	93.3	32	97	
BI in skin smears positivity	0	0	0	0	2	5.9	33	97.1	30	100	33	100	
Mitsuda test positivity	23	92	40	90.9	15	44.1	1	2.9	0	0	0	0	
Average Mitsuda (mm) ± SD	9.9 ± 2.5		6.6 ± 2.8		3.1 ± 3.2		0.5 ± 1.4		0 ± 0		0 ± 0		
Anti-PGL-I ELISA positivity	0	0	10	22.7	21	61.8	30	88.2	29	96.7	33	100	
Average ELISA index ± SD	0.5 ± 0.3		0.8 ± 0.8		2.9 ± 3.4		4.9 ± 3.9		7.2 ± 5.1		7.8 ± 5.7		
ML0024 qPCR positivity	4	16	12	27.3	6	17.6	5	14.7	6	20	11	33.3	
Household contacts (n = 826)													
Operational classification and clinical form of index case													
PB (n = 182)				MB (n = 644)									
TT (n = 60)		BT (n = 122)		BT (n = 160)		BB (n = 144)		BL (n = 130)		LL (n = 210)			
n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Mitsuda test positivity	54	90	111	91	141	88.1	135	93.7	115	88.5	184	87.6	
Average Mitsuda (mm) ± SD	8.1 ± 4.4		7.0 ± 3.0		7.7 ± 3.5		7.7 ± 3.6		6.9 ± 3.3		6.9 ± 3.4		
Anti-PGL-I ELISA positivity	8	13.3	15	12.3	25	15.6	24	16.7	19	14.6	47	22.4	
Average ELISA index ± SD	0.6 ± 0.4		0.6 ± 0.4		0.7 ± 0.5		0.8 ± 1.3		0.7 ± 0.6		1.2 ± 5.5		
ML0024 qPCR positivity	1	1.7	1	0.8	0	0	1	0.7	2	1.5	5	2.4	

PB, paucibacillary; MB, multibacillary; TT, tuberculoid; BT, borderline tuberculoid; BB, borderline; BL, borderline lepromatous; LL, lepromatous leprosy; BI, bacterial index; SD, standard deviation; PGL-I, phenolic glycolipid I.
For anti-PGL-I, considered positive result: ELISA index ≥ 1.1.

Results

The *M. leprae* qPCR in blood samples detected the presence of bacillary DNA in 22.0% (44/200) of leprosy patients: 23.2% (16/69) in PB patients, and 21.4% (28/131) in MB patients.

The ML0024 qPCR positivity assessed according to the patient's clinical form ranged from 16% (4/25) for TT to 33.3% (11/33) for LL patients (Table 1).

Among the 44 patients with positive ML0024 qPCR, 59% (26/44) were positive for anti-PGL-I ELISA, and 72% (32/44) had negative or weakly positive Mitsuda response.

The Kappa values obtained between the ML0024 qPCR and the tests mentioned were lower than 0.04, revealing lack of agreement.

The qPCR quantification of bacillary load in blood samples revealed values ranging from 870 up to 5.94×10^5 ML0024 DNA copies per mL of blood, which corresponds to TT and LL values, respectively. The average number of DNA copies did not show a direct relationship with the spectrum of clinical forms, nor with the operational classification (PB or MB).

Among household contacts, 1.2% (10/826) were positive for ML0024 qPCR in peripheral blood. DNA was detected in 1.1%

(2/182) of contacts of PB patients and in 1.2% (8/644) of contacts of MB patients (Table 1).

A high statistical significance was observed between the ML0024 qPCR positivity in blood of leprosy patients and household contacts ($p < 0.0001$).

All household contacts (10/10) with positive ML0024 qPCR also presented negative Mitsuda tests or weakly positive (0–7 mm) (p 0.0131) and 40% (4/10) were positive for anti-PGL-I ELISA (p 0.1283).

The contacts were followed up for a period of 7 years. In this period, 3.1% (26/826) developed leprosy, all of them were contacts of MB patients and 61.5% (16/26) were contacts of LL patients. Among these 26 contacts, ML0024 qPCR detected DNA from *M. leprae* in 11.5% (3/26), the ELISA test was positive in 57.7% (15/26), and Mitsuda test was negative or weakly positive in 84.6% (22/26).

The sensitivity and specificity parameters obtained for ML0024 qPCR in the blood of household contacts were 11.5% (3/26) and 99.1% (793/800), respectively. The ML0024 qPCR positivity among contacts presented an impressive OR of 14.78-fold towards leprosy development (95% CI 3.6–60.8; $p < 0.0001$), and positive likelihood ratio of 13.19 (95% CI: 3.6–48.1; $p < 0.0001$). The anti-PGL-I ELISA positivity presented

Test and type of contact	No. of positives	No. of negatives	Diagnostic parameters	OR (95% CI)	LR+ (95% CI)
ML0024 qPCR					
Affected	3	23	Sensitivity 11.5%	14.78 (3.6–60.8)	13.19 (3.6–48.1)
Healthy	7	793	Specificity 99.1%		
Anti-PGL-I ELISA ^a					
Affected	15	11	Sensitivity 57.7%	7.51 (3.4–16.7)	3.75 (2.6–5.4)
Healthy	123	677	Specificity 84.6%		
Mitsuda test ^b					
Affected	4	22	Sensitivity 15.4%	0.23 (0.08–0.66)	0.34 (0.14–0.85)
Healthy	357	443	Specificity 55.4%		

LR+, positive likelihood ratio; PGL-I, phenolic glycolipid I.
^aFor anti-PGL-I, considered positive result: ELISA index ≥ 1.1
^bFor Mitsuda test, considered positive result: node > 7 mm.

TABLE 2. Assessment of results for ML0024 qPCR, anti-PGL-I ELISA, and Mitsuda tests based on the positivity at diagnosis of the index case observed in healthy household contacts ($n = 800$) in comparison with those contacts that were affected by leprosy ($n = 26$)

7.51-fold higher risk of becoming ill (95% CI 3.4–16.7; $p < 0.0001$); whereas the positive Mitsuda test (> 7 mm) showed a 4.35-fold greater chance of protection (OR 0.23; 95% CI 0.08–0.66; $p = 0.0058$) (Table 2).

Discussion

The present study is the largest study to evaluate the presence of *M. leprae* DNA in peripheral blood samples of leprosy patients and household contacts. We have shown that the presence of *M. leprae* DNA in blood indicates a higher risk for leprosy development in contacts, which suggests a likely path of the infection process, after its passage through the mucosa of the upper respiratory tract and before the impairment of the peripheral nervous system. This infection process implicates a transient passage of bacilli through the bloodstream; almost one-quarter of patients presented positive PCR. However, the limitations of this study are the lack of multiple samples from the same individual collected at the same time and at different time-points, to demonstrate whether variability of bacterial DNA detection is due to sampling or to its microenvironmental requirements, which must be further investigated.

PCR positivity presented no correlation with clinical forms, anti-PGL-I ELISA, bacillary index, and Mitsuda test. Nevertheless, LL patients presented twice the frequency and higher bacterial load than observed in TT patients. It is debatable whether bacilli should not be expected in tuberculoid forms of the disease, as macrophages would kill and degrade the bacillus, including DNA, but *M. leprae* is an obligate intracellular pathogen that invades and multiplies within host mononuclear phagocytes, and immature monocytes can be reservoirs of fully viable DNA during *M. leprae* blood migration, a cellular event that seems to be required before the infection of Schwann cells and tissue macrophages.

The complete mechanism of infection of *M. leprae* is still unknown, but evidence of nasal and oral mucosa as entry sites have been provided [6–8,16]. Authors of the first seminal

publication that found *M. leprae* in the peripheral blood of LL patients have suggested that bacilli may be continuously present, but it may decrease during treatment [14]. Similarly, the detection of *M. leprae* DNA in nasal swabs of household contacts [4] reduced from 4% to 0% when the index case in each household was treated for 2 months, showing that effective MDT decreases repeat infection within the household.

Although the specificity of the PCR test in the blood was very high (99.1%), the sensitivity was low (11.5%), and no test alone would be worthwhile with such a low sensitivity, unless combined with other tests to bolster the leprosy diagnosis. It is relevant to emphasize that blood is not the best sample for the diagnostic detection of *M. leprae*, its regular temperature around 37°C does not constitute a suitable environment for the development and survival of *M. leprae*. The bacillus is presumably detected in the blood during the short period in which the infected cells migrate to the extremities of the body, where temperature ranges from 30 to 35°C, which favours *M. leprae* reproduction [17].

The presence of up to 10^5 viable leprosy bacilli/mL of blood both reflects and helps to explain the extreme widespread nature of *M. leprae* infection in patients with lepromatous leprosy [18]. The high titres of *M. leprae*-specific antibodies, although prevalent in LL leprosy patients, do not provide protection [19], and these factors may favour blood dissemination of the bacillus and its detection.

On the other hand, the specific immune cellular response observed among TT leprosy patients plays an important role against bacillary proliferation and dissemination, confining the bacillus to a few areas of the skin and/or nerves [17]. At the same time, PCR positivity observed in TT and BT patients might also imply an ongoing attack to the reticuloendothelial system and the recirculation of infected phagocytes into the bloodstream, which may account in part for the intermittent nature of leprosy bacteraemia [14].

Two studies have addressed the detection of *M. leprae* DNA in blood through conventional PCR. One of these

evaluated leprosy patients 8 years after MDT and observed 70.6% (12/17) positivity [20]. Having been conducted in an endemic area, the hypothesis of re-infection or relapse cannot be excluded, and a selection bias, due to the small number of patients evaluated, could not be ruled out. The second study evaluated 119 household contacts and observed 1.7% (2/119) positivity [9], which corroborates with 1.2% positivity observed in the present study, suggesting a similar PCR efficiency, especially considering that our sampling was eight times larger. The percentage of *M. leprae* DNA in peripheral blood samples of household contacts was 18 times lower than that among patients, similar to other studies that applied conventional PCR followed by a ³²P-labelled probe hybridization [9].

Recently, the *M. leprae*-specific repetitive sequence marker which targets an invariant region of the RLEP noncoding chromosomal element of dispersed repeats, has been shown to be more sensitive than other primer sets of unique alignment [11], most likely because its repetitive sequence is presented several times in the genome. Perhaps, a qPCR targeting RLEP sequence, which detects very low levels of DNA, would provide higher positivity rates in peripheral blood.

All PCR-positive contacts also presented negative or weakly positive Mitsuda test results, suggesting that besides the prognostic value, the immune cellular response cooperates in the early resistance against bacillary invasion of the mucosa.

The comparison of the presence of *M. leprae* DNA in the blood of contacts and the development of leprosy in this group showed an impressive 14.78-fold association between positive PCR and later disease onset. Besides that, the fact that all those who became ill were contacts of MB patients supports the theory that contacts of MB patients are at greater risk for the development of leprosy [21–23].

The small percentage of PCR positivity among contacts can disclose an important public health issue. Considering the latest official data of 219 075 new cases detected in the world [24] and an average of four household contacts per patient, this leads to an estimate of 876 300 household contacts of leprosy patients, and assuming the 1.2% PCR positivity in this group of individuals, it could be considered that 10 515 household contacts worldwide have *M. leprae* DNA in their bloodstream and are at greater risk of becoming ill.

Two publications [3,18] have shown that viable bacilli, potentially infective, were isolated from the peripheral blood of untreated leprosy patients, as judged by their capacity to multiply in the mouse footpad. However, because of the long-term test in mouse footpad with a restricted sensitivity, the detection of *M. leprae* mRNA through reverse transcription PCR may be a good option to evaluate the viability of blood-borne bacilli.

The carriage of bacilli in the blood of contacts in conjunction with greater chances for leprosy development in PCR-positive contacts are additional evidence of subclinical infection and those individuals without symptoms may behave as healthy carriers with a potential role in the chain of transmission of leprosy in endemic regions.

These findings have important implications for disease management and clinical practice. The concomitant use of tools to detect *M. leprae* DNA in the blood, anti-PGL-I circulating antibodies and the Mitsuda test, will allow us to identify high-risk individuals, justifying the chemoprophylaxis of close contacts of leprosy patients who fit the highest-risk categories in this study, as has been suggested elsewhere [25].

Acknowledgements

The authors are grateful to the entire team of the UFU National Reference Centre for Sanitary Dermatology and Leprosy, to Dr Maria Esther Salles Nogueira from Lauro de Souza Lima Institute for the donation of Mitsuda antigen, and to Dr John S. Spencer from the Department of Microbiology, Immunology and Pathology of the Biomedical Sciences and Veterinary Medicine College of the Colorado State University, CO, USA, for the donation of the PGL-I antigen for the ELISAs.

Financial Support

This study was supported with grants from: Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and by the National Fund for Health/Brazilian Ministry of Health.

Transparency Declaration

All authors declare no conflicts of interest.

References

1. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int J Lepr* 1966; 34: 255–273.
2. World Health Association; WHO expert committee on leprosy, 6th report. Technical Report Series No. 768. Geneva, Switzerland: World Health Association, 1988.

3. Lane JE, Balagon MV, Dela Cruz EC et al. *Mycobacterium leprae* in untreated lepromatous leprosy: more than skin deep. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31: 452–482.
4. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 518–552.
5. Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. *Lep Rev* 1997; 68: 301–315.
6. Patrocinio LG, Goulart IMB, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 44: 311–316.
7. Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Bühler-Sekula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid I antigen. *Braz J Otorhinolaryngol* 2010; 76: 579–587.
8. Da Silva Martinez T, Nahas AA, Figueira MMNR et al. Oral lesion in leprosy: borderline tuberculoid diagnosis based on detection of *Mycobacterium leprae* DNA by qPCR. *Acta Derm Venereol* 2011; 91: 704–707.
9. Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99: 509–512.
10. Goulart IMB, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch Dermatol Res* 2007; 299: 267–271.
11. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e328.
12. Martinez AN, Brito CFPC, Nery JAC et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3154–3159.
13. Lini N, Shankernarayan NP, Dharmalingam K. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. *J Med Microbiol* 2009; 58: 753–759.
14. Drutz DJ, Chen TS, Lu WH. The continuous bacteremia of lepromatous leprosy. *New Engl J Med* 1972; 287: 159–164.
15. Lobato J, Costa MP, Reis EM et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lep Rev* 2011; 82: 1–14.
16. Martinez TS, Figueira MMNR, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IMB. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1653–1658.
17. Ridley DS, Job CK. The pathology of leprosy. In: Hastings RC, ed. *Leprosy*. Edinburgh, United Kingdom: Churchill Livingstone, 1985: 100–133.
18. Drutz DJ, O'Neill SM, Levy L. Viability of blood-borne *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis* 1974; 130: 288–292.
19. Chin-A-Lien RAM, Faber WR, Van Rens MM, Leiker DL, Naafs B, Klatser PR. Follow-up of multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-I based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? *Lep Rev* 1992; 63: 21–27.
20. Santos AR, Balassiano V, Oliveira ML et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals: eight years completion of anti-leprosy therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 1129–1133.
21. Fine PE, Sterne JA, Panninghaus JM et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 91–102.
22. Van Beers S, Hatta M, Klatser PR. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. *Int J Lepr* 1999; 67: 243–249.
23. Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 101–105.
24. WHO. Global leprosy situation, 2012. *Wkly Epidemiol Rec* 2012; 34: 317–328.
25. Goulart IMB, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* 2008; 300: 269–290.

ANEXO E – RESUMO: ARAUJO ET AL 2015.

**DETECÇÃO RÁPIDA DE RESISTÊNCIA
MEDICAMENTOSA EM *MYCOBACTERIUM LEPRAE*
POR PCR EM TEMPO REAL E ANÁLISE DE
DISSOCIAÇÃO EM ALTA RESOLUÇÃO (PCR-HRM)**

Sergio ARAUJO ^(1,2,3), Luiz Ricardo GOULART ^(1,2),
Richard TRUMAN ⁽³⁾, Isabela Maria Bernardes
GOULART ^(1,2), Diana WILLIAMS ⁽³⁾

⁽¹⁾ Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária e Hanseníase (CREDESH), Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG, Brasil.

⁽²⁾ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), MG, Brasil.

⁽³⁾ Department of Health and Human Services (DHHS), Health and Resource Services Administration (HRSA), Healthcare Systems Bureau (HSB), National Hansen's Disease Programs (NHDP), Laboratory Research Branch, Baton Rouge, LA, USA.

Introdução: Apesar de três décadas de tratamento eficaz com poliquimioterapia (PQT), a hanseníase persiste. Um aumento nos números de casos de recidivas e falência terapêutica devido à resistência aos medicamentos na PQT tem sido observado em todo o mundo, o que juntamente com o surgimento de casos de resistência primária pode minar as estratégias de controle existentes. **Objetivo:** Avaliar a PCR em tempo real e análise de dissociação em alta resolução (PCR-HRM) como uma ferramenta de triagem para a identificação rápida de susceptibilidade à dapsona (DDS), rifampicina (RMP) e ofloxacina (OFX) em *Mycobacterium leprae*, como uma técnica eficaz e de baixo custo. **Materiais e Métodos:** Cepas de referência (19), incluindo tipo selvagem susceptível e mutações mais comuns nos genes *folP1*, *rpoB*, e *gyrA*, respectivamente associadas a resistência à DDS, RMP e OFX, foram utilizadas para caracterização da PCR-HRM. Especificidade foi determinada com DNA de outras infecções microbianas. Sensibilidade foi avaliada com DNA purificado da cepa Thai-53. Foram incluídas 211 amostras clínicas de pacientes com hanseníase, positivas para DNA de *M. leprae* em PCR espécie-específica (RLEP). **Resultados:** O limite de detecção foi 10^4 bacilos/ml, ou seja, dez bacilos *M. leprae*(1 μ l) iniciais em reação de 20 μ l. Com exceção do *M. lepromatosis*, classificado em um grupo diferente de ambos os mutantes de referência e do tipo selvagem, nenhum outro microrganismo apresentou resultados.

Todas as cepas resistentes foram identificadas como variantes distintas do perfil susceptível. O sequenciamento de DNA confirmou os genótipos de resistência. O número de amostras que amplificaram na PCR-HRM para os genes *folP1*, *rpoB* e *gyrA* foram: 201 (95,3%), 197 (93,4%) e 193 (91,5%), respectivamente. Comparativamente, amplificaram nas condições de PCR para o método de sequenciamento: 194 (91,9%) para *folP1*, 188 (89,1%) para *rpoB*, e 176 (83,4%) para *gyrA*. Quatro amostras (1,9%) apresentaram perfis variantes na PCR-HRM para *folP1* (alelos mutantes T53A, T53I, P55L & P55R), e uma dessas amostras (0,5%) apresentou perfil variante na PCR-HRM para *rpoB* (S456L). Todos os perfis na PCR-HRM para *gyrA* foram susceptíveis. Houve 100% de concordância entre os perfis da PCR-HRM e resultados do sequenciamento de DNA. A PCR-HRM foi mais sensível do que o sequenciamento na detecção de infecções mistas com cepas susceptíveis e resistentes, detectando tão pouco quanto 10% do alelo mutante em uma amostra com 90% do alelo selvagem. O sequenciamento de DNA direto da PCR apenas detectou o alelo mutante quando este era 40% em 60% de alelo selvagem. **Conclusão:** Demonstramos a utilidade da PCR-HRM como ferramenta confiável para o teste de susceptibilidade diretamente em amostras clínicas. Este é um método que evita manipulações pós-PCR e pode analisar 42 amostras em uma única placa com 96 poços num período inferior a 4 horas. Isso melhora a aplicabilidade em regiões endêmicas e reduz o custo e o tempo para triagem de susceptibilidade, fornecendo assim informações valiosas não só para o tratamento do paciente, mas para o contexto global de vigilância à resistência medicamentosa na hanseníase. Recomendamos que todas as amostras com perfis variantes na PCR-HRM sejam avaliadas por sequenciamento de DNA.

Palavras-chave: Hanseníase; *Mycobacterium leprae*; Biologia Molecular; Resistência Microbiana a Medicamentos; Técnicas Genéticas.

Apoio financeiro: FAPEMIG, CNPq, CAPES, FNS/MS.



ANEXO F- APROVAÇÃO CEP



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

Av. João Naves de Ávila, nº 2160 - Bloco J - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
 CEP 38400-089 - ☎ (034) 3231-8046 FONE/FAX (034) 239-4131

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Nº 099/03

Uberlândia, 07 de julho de 2003.

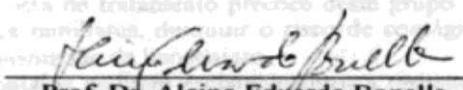
Ilmo(a) Sr.(a).

Prof.(a).Dr.(a). Isabela Maria Bernardes Goulart

Prezado(a). Professor(a),

Informamos-lhe que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia examinou e **APROVOU** o projeto de pesquisa "**Caracterização Imunológica e Molecular dos Pacientes com Hanseníase e seus Comunicantes para Identificação de Grupos de Risco**", protocolado sob o número **048/2003**, do qual V.Sa. figura como pesquisador responsável, para ser desenvolvido a partir de 04/07/2003.

Em adendo, informamos que o prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma da Res. 196/96 CNS.


 Prof. Dr. Alcino Edyardo Bonella
 Coordenador do CEP/UFU

ANEXO G - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: Caracterização Imunológica e Molecular dos Pacientes com Hanseníase e seus Comunicantes para Identificação de Grupos de Risco.

A hanseníase é uma doença que afeta a pele e os nervos. No início os sintomas são dificilmente notados e por ser transmitida principalmente pelo nariz, este local pode ser precocemente afetado. Durante o desenvolvimento da doença as lesões de pele são mais aparentes e os nervos podem ser irreversivelmente danificados resultando em graves sequelas. Quanto mais demora para que a doença seja diagnosticada e o tratamento iniciado, maior será o dano. O diagnóstico pode ser dificultado porque os exames atuais não conseguem detectar o bacilo quando eles estão em pequena quantidade no organismo. Atualmente a hanseníase tem cura e muitos são os esforços para que ela deixe de ser um problema de saúde pública no Brasil. Mas, como não há uma vacina específica contra a hanseníase, é muito importante que se possa identificar os portadores sadios do bacilo que causa a doença, bem como os contatos de pacientes que estejam no estágio inicial da infecção, ainda subclínico, para que se possa definir os grupos que tenham maior risco de desenvolver a hanseníase. Para isso, a equipe de saúde do Centro de Referência Nacional Hanseníase/Dermatologia Sanitária (CREDESH/UFU) está propondo uma pesquisa onde deverão ser realizados os exames de rotina para o diagnóstico da doença nos pacientes, tais como baciloscopia, teste de Mitsuda e biópsia de lesão de pele e, nos contatos domiciliares, serão realizados exames dermato-neurológico, teste de Mitsuda (uma injeção de 0,1 ml intradérmica no antebraço para avaliar a imunidade celular/resistência) e teste sorológico ELISA (para detectar anticorpos contra a bactéria que causa a hanseníase no sangue da pessoa testada, coletando uma gota de sangue com uma picada na ponta do dedo e 1 tubo de 8 ml, respectivamente, para avaliar se ela está ou foi infectada indicando que a pessoa corre um risco maior de desenvolver a hanseníase). Nos pacientes e seus contatos serão realizados ainda coleta de swabs das cavidades nasal/ bucal com escovinha própria e biópsia de pequeno fragmento de corneto nasal com pinça de nariz, ambos os procedimentos para identificar DNA do bacilo de Hansen. Cabe ressaltar que todo material utilizado será estéril e descartável, e no caso das biópsias, serão realizadas com anestésico local. O material coletado será enviado ao laboratório do CREDESH/UFU, onde serão realizados os exames pela técnica de DNA e os resultados serão mantidos em sigilo. Espera-se que com este estudo seja possível detectar em que estágio de desenvolvimento se encontra a doença no paciente, bem como definir os possíveis portadores sadios e aqueles que já estejam infectados com o bacilo entre os comunicantes, para seguimento periódico pela equipe do CREDESH/UFU, subsidiando uma proposta de tratamento precoce deste grupo de risco, a fim de prevenir o aparecimento da doença nos familiares, diminuir o risco de contágio da população e dessa forma, interromper a cadeia de transmissão da hanseníase. É direito do paciente e seus contatos pedirem esclarecimentos a respeito da finalidade da pesquisa, destino do material coletado e resultados dos exames realizados e, se concordarem em participar da pesquisa, poderão desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem que haja nenhum prejuízo próprio. Pelos presentes termos apresentados por este documento, eu,

_____, concordo em colaborar com a
pesquisa, declarando estar ciente dos riscos, benefícios e direitos. Assinatura:

ANEXO H – ARTIGO EM INGLÊS SUBMETIDO À REVISTA *CLINICAL INFECTIOUS DISEASES*

Title: Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy

Authors: Sergio Araujo^{*a,b}, Larissa Oliveira Freitas^a, Luiz Ricardo Goulart^{a,b,c,d}, Isabela Maria Bernardes Goulart^{a,b}

^aNational Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy, Clinics Hospital, Federal University of Uberlandia, MG, Brazil; ^bPostgraduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Uberlandia, MG, Brazil; ^cInstitute of Biochemistry and Genetics, Federal University of Uberlandia, MG, Brazil; ^dDept. of Medical Microbiology and Immunology, University of California Davis, Davis, CA, USA.

Running Title: Leprosy aerial route of infection

*Corresponding author: Sergio Araujo; Tel: +55 (34) 998954956; e-mail: saraujo@gmx.com. Address: National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH/HC/UFU). Av. Aspirante Mega, 77. Bairro Jaragua. Uberlandia, MG, Brazil. CEP: 38.413-018.

Financial support: This study was supported with grants from: Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and by the National Fund for Health/Brazilian Ministry of Health.

ABSTRACT

Background: Leprosy persists as public health problem. The chain of transmission and mechanism of infection are not completely understood. Here we investigated the route of infection and of disease onset, from airways exposure, colonization, and bloodstream dissemination. **Methods:** *M. leprae* DNA was detected through qPCR in nasal vestibule, nasal turbinate mucosa, and peripheral blood samples, plus anti-PGL-I serology and skin tests, from the same individual, of 113 leprosy patients and 104 household contacts of patients (HHCs). Bivariate statistics and multiple correspondence analysis were employed. **Results:** DNA positivity among patients: 66.4% (75/113) in nasal swabs, 71.7% (81/113) in nasal turbinate biopsies, 19.5% (22/113) in blood samples, and seropositivity of 62.8% (71/113); with increasing incidences towards the multibacillary (MB) pole of the clinical spectrum. Positivity among HHCs: 18.3% (19/104) for anti-PGL-I, 49% (51/104) for nasal swabs, 53.8% (56/104) for nasal biopsies, and 6.7% (7/104) for blood. During the follow-up of 5-7 years, out of 104 HHCs, 7 developed leprosy (6.7%). Risk for the disease outcome was estimated comparing results of HHCs who develop leprosy with those not affected. Neither nasal passage nor mucosa positivity was determinant of later disease onset; howsoever, blood presence increased the risk for disease development [RR/LR+ 5.54 (95% CI 1.30 - 23.62)], as well did the seropositivity [LR+ 3.69 (95%CI 1.67 - 8.16); RR 5.97 (95%CI 1.45 - 24.5)]. **Conclusions:** Our findings strongly suggest that the aerial route of infection and transmission is predominant, and HHCs contribute to the infection risk to themselves and most probably to others.

Key words: Leprosy, Epidemiology, *Mycobacterium leprae*, Quantitative Real-Time PCR, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, phenolic glycolipid I.

Introduction

Leprosy is one of the oldest infectious diseases to affect mankind and nowadays continues to be a public health problem, particularly in Brazil, accounted for 92% of the new cases reported during 2014 in the region of the Americas[1].

Untreated leprosy patients are generally considered the main source of transmission. However, this contrast with more than thirty years of an effective and globally available treatment and the occurrence of new cases among people with no previous contact with patients, indicating that there must be other undisclosed sources of infection[2-6].

Several studies have demonstrated widespread dissemination of bacilli in endemic regions and that contact with a leprosy patient was associated with increased risk for disease onset[2, 5-7]. On the other hand, most of the exposed individuals do not manifest the disease, which supports the hypothesis of asymptomatic infection and its potential link to the chain of transmission of *Mycobacterium leprae*[2, 3, 5, 7].

Leprosy bacilli cannot be cultivated in vitro and has an extremely long generation time (about 15 days). In addition, there are leprosy cases in which bacilli are not detected by the available tests[8], and the armadillo as the only natural host and the best animal model[9], impose restraints to experimental investigations.

Thus, the advances of molecular techniques, particularly involving DNA based methodologies more sensitive and specific than bacilli staining[10, 11], applied to epidemiological studies are crucial to elucidate hypotheses about pathways of infection, transmission and disease progression[12, 13].

In order to investigate leprosy aerial route of infection and transmission, this study proposed to detect the presence of *M. leprae* DNA in nasal swab samples from nasal vestibules, nasal turbinate biopsies, and peripheral blood, from the same individual, collected of leprosy patients and household contacts of leprosy patients (HHCs). The participants' humoral and cell-mediated immune responses to *M. leprae* were also investigated.

Material and Methods

Subjects

Assays were performed in samples collected from 113 untreated leprosy patients and 104 HHCs who attended the National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH) at the Federal University of Uberlandia (UFU), Minas Gerais, Brazil, during the period from 2003 to 2015. Were included in the study only individuals with complete set of clinical and laboratory parameters, and that were followed-up for a minimum period from 5 to 7 years. The CREDESH is a public health unit that routinely works on leprosy prevention, detection, active search, and provision of treatment and healthcare to those affected by the disease.

All leprosy patients were diagnosed by a committee of leprosy experts, based on clinical and laboratory examinations. They were categorized according their clinical manifestation into the Ridley-Jopling five-group system [TT (tuberculoid), BT (borderline-tuberculoid), BB (mid-borderline), BL (borderline-lepromatous), and LL (lepromatous)]. For treatment purposes, patients were also categorized into paucibacillary (PB) or multibacillary (MB) operational classifications.

Household contact was defined as a person who lives or has lived in the same dwelling as a leprosy patient in the last 5 years prior to the patient's diagnosis. All HHCs were initially examined for signs or symptoms of the disease by specialized physicians experienced in leprosy, in a dermato-neurological clinical examination. HHCs' results corresponded to the time point of diagnosis of their index cases.

For the purpose of data analysis, the HHCs were stratified according to the clinical (TT, BT, BB, BL, LL) and operational (PB, MB) classifications of their index cases. For follow-up analysis, contacts were further stratified into two classes: affected (those who developed leprosy) and healthy (those without any sign or symptom of disease). Among the contacts affected by leprosy, were excluded those who presented signs or symptoms of leprosy at the time of their first examination (co-prevalence).

Incomplete data, inconclusive results in any of the tests, individuals with comorbidities or treatments that could interfere with results, and those who decided not to participate, were excluded from this study.

The research protocol was approved by the institutional review board at the Federal University of Uberlandia (#099/2003) and was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of

Helsinki. All participants agreed to take part in this study with written informed consent. Patients and HHCs that developed the disease received free healthcare and adequate treatment for their illnesses.

Methods

This study evaluated the presence of *M. leprae* DNA in samples collected from: the nose vestibule by swabbing sterile flexible brushes into both nostrils; the nose mucosa by biopsy of nasal inferior turbinate, and the peripheral blood through venipuncture. The participants had also evaluated the presence of antibodies in sera against *M. leprae*-native phenolic glycolipid I (PGL-I), through an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The specific delayed hypersensitive response to *M. leprae* antigens was also evaluated through the intradermal Mitsuda test, also known as lepromin skin test.

To detect *M. leprae* DNA, a previously described quantitative real-time PCR (qPCR) primer/probe assay[10] targeting the *M. leprae* species-specific genomic element of dispersed repeats (RLEP) was performed in the ABI 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Samples of skin biopsy and slit-skin smears from the leprosy patients were also evaluated through the same qPCR assay. The sensitivity and lower limit of detection was determined by analyzing 2-fold serial dilutions of mouse footpad-derived *M. leprae* with starting quantity of 1.0×10^7 ($1.0E+7$) bacilli per qPCR reaction (bacilli/reaction), from which DNA was extracted and amplified following the same qPCR protocol. A 10-fold standardized dilution of *M. leprae* DNA was used in each assay to establish the standard curve. Quantification of the samples by the qPCR instrument software was calculated by interpolation from the standard curve to yield the bacilli/reaction number.

To assess the immunological status of the participants, an indirect ELISA to detect circulating IgM antibodies against the *M. leprae* derived PGL-I antigen, was performed in serum samples as previously described[14]. To moderate inter and intra variations between assays, absorbance results measured at 492 nm were converted into an ELISA index (EI), in which the optical density (OD) of the sample was divided by the OD of the cut-off ($EI = OD_{\text{sample}} / OD_{\text{cut-off}}$). Positivity threshold was 1.1.

To evaluate the cell-mediated hypersensitive response, an intradermal injection with heat-killed *M. leprae* suspension, namely the Mitsuda test, was also conducted. After 21 to 28 days, was measured

the transverse diameter in millimeters (mm) of the induration (not erythema) at the site of the injection, and considered positive results equal or above 7 mm (≥ 7 mm).

Statistical analysis

Data examination and summarization was carefully conducted. Data set did not present Gaussian distribution; for this reason non-parametric statistical methods were applied. For comparing two independent sets of observations (e.g. PB vs. MB), the Mann-Whitney test and the Z-test of proportions were conducted. For the multiple comparisons of independent groups, the Monte Carlo test was applied for proportions and the Kruskal-Wallis test with a posthoc Dunn's pairwise analysis was used for comparisons among means.

The Fisher's exact test (two-tailed) was used to investigate bivariate association through pairwise comparisons of dichotomous data. To determine the statistical linear dependence between pairs of continuous observations, the Spearman correlation coefficient (r) was calculated. The Kappa test coefficient (k) assessed the agreement between tests. To measure the probability of congruence between paired tests the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (95% CI) was estimated through logistic regression analysis.

To better understand the complex relationship between all results at the same time, the exploratory multivariate technique of multiple correspondence analysis (MCA) was executed. The data matrix was represented in a graphical display where associations were uncovered by the distance between the points (variables, individuals and results) in a Euclidean geometric space.

For the follow-up data analysis, the performance of the tests were evaluated, sensitivity and specificity were calculated, and the probabilities for later leprosy onset were estimated through the Positive and Negative Likelihood Ratios (LR+ and LR-), Relative Risk (RR), and associated 95% CI.

Statistical analyses were performed using software: GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), XLStat version 2015.6.01.24996 (Addinsoft, Paris, France) and BioEstat version 5.3 (Mamiraua Institute for Sustainable Development, Belem, PA, Brazil). The threshold for statistical significance was set at the alpha level of 5%.

Results

The qPCR positivity for the detection of *M. leprae* DNA among patients was: 66.4% (75/113) in nasal swabs, 71.7% (81/113) in nasal turbinate biopsies, and 19.5% (22/113) in peripheral blood samples. The mean quantities of *M. leprae* detected in the different patient samples were: 1.8E+07 bacilli/reaction in nasal swabs, 4.1E+07 bacilli/reaction in nasal turbinate biopsies, and 9.3E+03 bacilli/reaction in peripheral blood samples (Kruskal-Wallis, $P < 0.0001$). The evaluation of the humoral response measured by the anti-PGL-I ELISA demonstrated total seropositivity of 62.8% (71/113), with 3.3 as mean EI value. The observed frequencies for all tests results increased towards the MB side of the clinical spectrum (Table 1), excluding the Mitsuda test results; in which PB patients presented 97% of positive reactions ≥ 7 mm, and only 11% of the MB patients had positive reactions (Z-test and Mann-Whitney, $P < 0.0001$). The comparisons between the PB versus (vs.) MB patients' results were statistically significant for all the parameters evaluated (Z-test and Mann-Whitney, $P \leq 0.05$). Correspondingly, the differences between results for the clinical manifestations were as well significant (Monte Carlo and Kruskal-Wallis, $P < 0.0001$) (Table 1).

The bivariate exploration of patients' data revealed an intricate contingency relationship between all pairs of variables. The Fisher's exact test (two-tailed) demonstrated that for each pairwise comparison of dichotomous data (positive or negative), there were substantial associations between every two variables examined [all P values ≤ 0.003 (comparison of qPCR in blood vs. anti-PGL-I ELISA results)]. The linear statistical dependence between pairs of observations, expressed by the Spearman r coefficient (Table 2), also showed significant correlations between every pair of continuous data (qPCR mean quantities of bacilli, and anti-PGL-I ELISA indexes), except for the comparison of qPCR in blood vs. qPCR in nasal swabs [all P values ≤ 0.02 (comparison of qPCR in nasal swab vs. anti-PGL-I ELISA results)]. With regard to the agreement between tests, the kappa test k coefficients were obtained (Table 2). The OR output from logistic regressions also indicated high probability of congruence between paired tests (Table 2).

In order to further explore the complex interaction among the tests results and the classification of the patients, the multivariate statistical method of MCA was conducted and results presented in a graphical display (Figure 1). The application of MCA was useful for an intuitive visual interpretation of

associations between parameters, where the distance between points plotted in the Euclidian space denoted the patient profile for all tests at the same time. The main clusters observed were: points representing negative results to the qPCR in skin biopsy, qPCR in skin smears, and anti-PGL-I ELISA, close to the PB and TT patients' classifications; points representing positive results to the qPCR in skin biopsy, qPCR in skin smears, qPCR in blood, and anti-PGL-I ELISA, close to the MB pole and its clinical manifestations BB, BL and LL; and also grouping of the positivity or negativity to qPCR results for both nasal swab and nasal turbinate biopsy samples (Figure 1).

Among the HHCs the overall qPCR positivity for the different samples were: 49% (51/104) for nasal swabs, 53.8% (56/104) for nasal turbinate biopsies, and 6.7% (7/104) for blood samples. The mean quantities of *M. leprae* among the different samples analyzed were: 1.8E+04 bacilli/reaction for nasal swabs, 1.3E+05 bacilli/reaction for nasal turbinate biopsies, and 1.4E+04 for peripheral blood samples (Kruskal-Wallis, $P = 0.0015$).

Regarding the anti-PGL-I serology, the overall positivity among HHCs was 18.3% (19/104), with 0.7 as mean EI. Serum antibodies against PGL-I were positive for 21% (17/81) of the HHCs with MB index cases (Table 2). Conversely, only two (4.5%; 2/23) of the HHCs with a PB index case presented positivity for anti-PGL-I, but not statistically significant (Z-test, $P = 0.2001$). The comparison between the mean ELISA indexes obtained for the HHCs of PB patients versus the results from contacts of MB patients were significantly different (Mann-Whitney, $P = 0.0037$) (Table 3).

Interestingly, the logistic regression analysis of the HHCs' data, yielded significant congruency of results when compared the qPCR in nasal swabs vs. qPCR in turbinate biopsies [OR = 2.3 (95% CI 1.0 - 5.1)]. The other noteworthy output from the statistical analysis of HHCs results, was for the comparison of the qPCR in nasal turbinate vs. anti-PGL-I ELISA serology [Fisher's exact test, $P = 0.046$; OR = 4.2 (95% CI 1.2 - 14.8)].

In the multivariate MCA exploration of the HHCs' data, was observed cluster associations between: positive results to both qPCR in blood and anti-PGL-I; positive results to both qPCR in nasal swab and nasal turbinate biopsies; negative results to both qPCR in blood and anti-PGL-I; and negative results to both qPCR in nasal swabs and nasal turbinate biopsies (Figure 2).

A comparison between the qPCR mean values obtained for patients vs. the values obtained for HHCs revealed that for the both sites in the nose (surface and mucosa) the means differed in a statistically significant degree from each other (Mann-Whitney, $P < 0.0001$). The anti-PGL-I mean EI values observed for patients and contacts also presented a statistically significant difference (Mann-Whitney, $P < 0.0001$). The comparisons for blood mean quantities were not statistically significant ($P = 0.8186$).

After the initial evaluation, the group of HHCs was monitored and out of the 104 contacts, 7 (6.7%) developed leprosy during a follow-up of 5 to 7 years. The probability of disease outcome was estimated comparing the results of those who were affected by disease, with the results of those who did not presented clinical manifestations during follow-up (Table 3). Having considered in the risk assessment both the likelihood and the relative risk ratios, it was clear the elevated probability for later disease onset when observed positive results for the qPCR in blood samples [LR+ and RR 5.54 (1.30 - 23.62)], as well for the seropositivity to anti-PGL-I [LR+ 3.69 (1.67 - 8.16); RR 5.97 (1.45 - 24.5)] (Table 4). A table with the combined results to the qPCRs and ELISA was added as supplementary data (Table 5).

Discussion

We previously have published reports on *M. leprae* PCR[15], *M. leprae* DNA in upper airways [2, 12, 16, 17], and *M. leprae* DNA in blood of contacts[3] and blood donors[5]. In the current study, we evaluated all these sites in the same individual, with a much more sensitive technique of quantitative real-time PCR.

Even though there is no reason to discard opportunistic routes by which *M. leprae* could infect the host, it is coherent that the millennia lasting evolutionary success of this pathogen was not fortuitous, and there must be a preferred via of infection which conferred the necessary fitness to strive as an exclusively human obligate intracellular pathogen.

The *M. leprae* is non-motile and rely on the host for dispersal. It's known that untreated patients shed an enormous amount aerosolized bacilli, and suspended *M. leprae* could land anywhere in the surrounding environment. The detection of *M. leprae* in soil, water, or other surfaces in endemic

settings is a clear indication of this rationale. However, the counterpart mode by which it enters into a new host is not clear.

Our unprecedented extensive data set analysis and assiduous characterization of the study participants, generated robust findings and provided molecular evidences in support of our theory that: the upper respiratory tract, particularly the nose, is the main portal for the entry and exit of *M. leprae*; exposure leads to infection of nasal mucosa, which elicit immune responses (cell-mediated and humoral); and if colonization is successful, *M. leprae* is transported through bloodstream and disseminated to favorable sites of growth (i.e. myelin-producing Schwann cells). Moreover, bacilli are widespread in endemic populations and asymptomatic individuals are of paramount importance in the insidious persistence of transmission.

Based on this hypothesis, the exposure to aerosolized *M. leprae* and its retention in the nasal passage is the first step in the route of infection, which was confirmed by the detection of *M. leprae* DNA in nasal swab samples of 6 out of 7 HHCs who were affected by leprosy during follow-up.

The respiration captures any particulate matter suspended in the air into the nose passage, and the organism has several mechanisms of defense against microbial invasion. The most plausible transmission mechanism of *M. leprae* is that, it evades airways epithelial clearance[18], which allows mucosal colonization, and subsequently, exhaled and inhaled respiratory droplets bearing *M. leprae* are airborne transmitted from person to person.

The presence of *M. leprae* DNA in half of the nasal swab samples from HHCs reflected the high prevalence of bacilli in the nose of healthy persons. Although not markedly associated to the prediction or the onset of infection, it was an indirect evidence of the role of asymptomatic carriers as a neglected mode of dispersal for *M. leprae*.

The second step in the route of infection was characterized by the likewise high prevalence of *M. leprae* detected in nasal biopsies samples of the asymptomatic individuals observed in this study. Once the bacillus has successfully infected the mucosa, innate immune responses will play an important role against bacillary proliferation and dissemination[19]. The observed associations and increased chances for positive results in both nasal swab and turbinate biopsy samples from patients

and HHCs, indicated that the subclinical infection seems to be a far more common outcome in the host-pathogen interaction than generally accepted.

After initial infection, the heterogeneity of individual responses will determine whether it spontaneously heals or presents one of the manifestations within the broad clinical spectrum of leprosy disease[20]. Nevertheless, we once more demonstrated the irrefutable existence of *M. leprae* asymptomatic carriage and subclinical infection[2, 18, 19].

By the same token, subsequent to *M. leprae* invasion of the mucosa, it is likely drained into the vast lymph capillary network which originates from the nasal turbinate. The drainage to lymph nodes may well induce the production of antibodies against *M. leprae*. Therefore, it seems that anti-PGL-I production is present during the early stages of *M. leprae*-human host interaction. The present study corroborate with our previous reports which demonstrated that anti-PGL-I serology can help determine those with subclinical infection and those who are at greater risk for developing disease[2, 3, 7, 21].

The human nose is well vascularized with arteries and veins, and we hypothesize that after infection and colonization, *M. leprae* infected cells are transported through bloodstream circulation, leading to secondary and more favorable sites for *M. leprae* establishment. When *M. leprae* was detected in blood samples, we confirmed it can successfully enter the circulatory system, substantiating the systemic infection. However, the low prevalence observed indicated it is a transitory event, mostly linked to BL and LL in patients, regarded as systemic manifestations. Nonetheless, was observed that among the patients and HHCs that developed the disease, whose qPCR in blood were positive, all of them were also positive for nasal biopsy samples, strengthening our proposed route of infection. Accordingly, our results verified that presence of *M. leprae* in the peripheral blood determined high risk for the development of leprosy; as we have previously reported, but with a different *M. leprae*-specific gene fragment detected[3]. In addition, the only access to a normal not traumatized nerve endoneurial compartment would be hematogenous, given that, the highly protective barrier of the perineurium isolates the Schwann cells.

The overall frequency of positive results among HHCs revealed that: *M. leprae* is widespread among them; HHCs experience high bacillary burden regardless of their index case disease manifestation;

and that, HHCs comprise a recognizable group of individuals that contribute to the infection risk to themselves and most probably to others.

Based on this evidences, the adoption of chemoprophylaxis for HHCs as a prevention strategy could additionally reduce bacilli burden in endemic communities, and assist to interrupt the transmission of leprosy.

Conflicts of interest. All authors declare no conflicts of interest.

Authors' contributions: SA, IMBG, and LRG conceived and designed the study; SA and LOF carried out the laboratory analysis; SA, IMBG, LRG interpreted data and prepared the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: The authors are grateful for the commitment of the staff of the National Reference Center for Sanitary Dermatology and Leprosy (CREDESH) in providing outstanding patient care for the individuals involved in this research, as well for the technical support of the staff of the Laboratory of Molecular Pathology and Biotechnology at CREDESH, personally to Thiago Pescador.

Funding: This study was financially supported in Brazil with grants from: Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG), Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazilian Coordination for Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and by the National Fund for Health/Brazilian Ministry of Health.

Table 1. Laboratory tests frequency according to the operational and clinical classifications of leprosy patients.

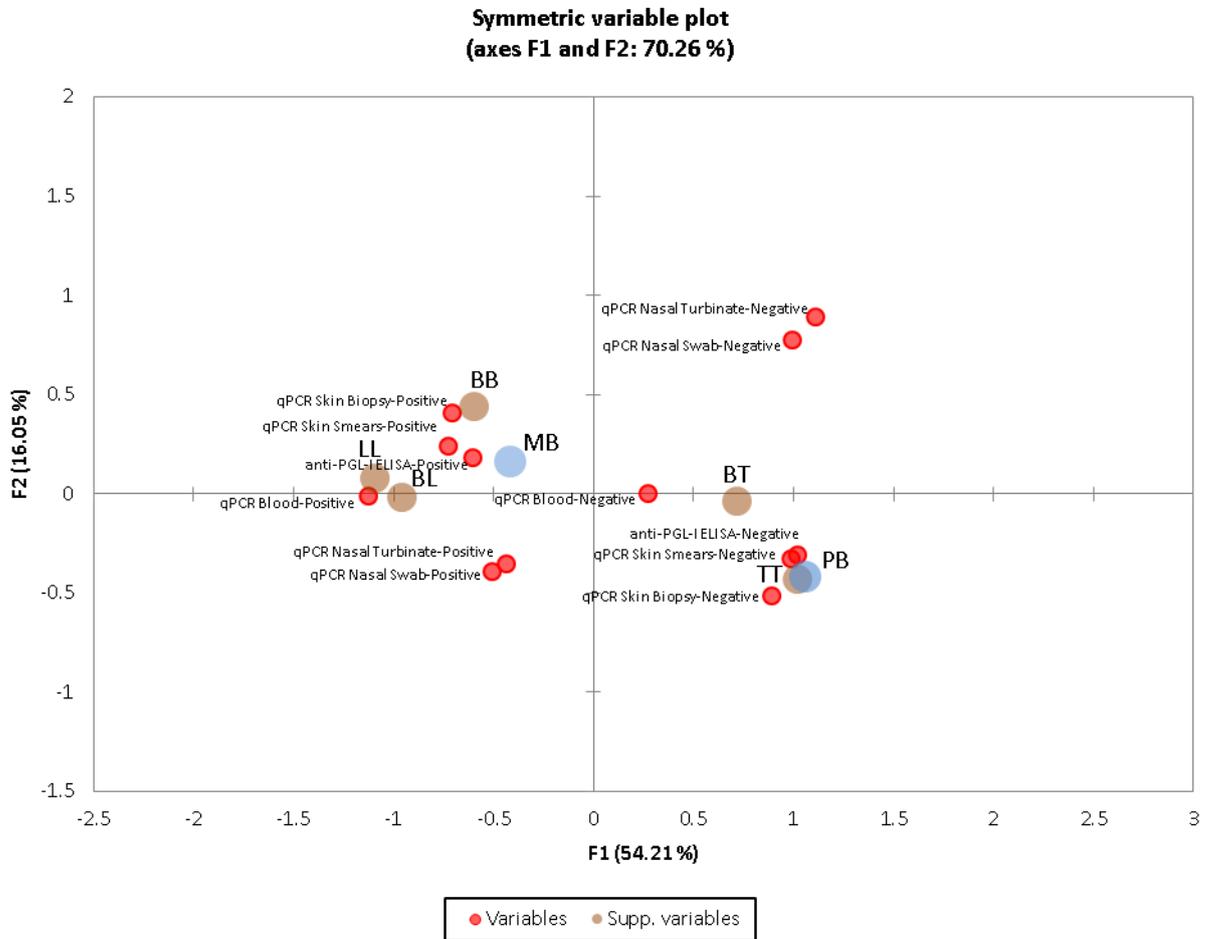
Laboratory tests	Patients (n=113)												
	Operational and Clinical Classification												
	PB (n=32)				P-value	MB (n=81)				P-value			
N		%		N		%							
anti-PGL-I ELISA positivity [†]	3		9.4	< 0.0001	68		83.9						
mean ELISA index ± SD	0.7	±	0.6	< 0.0001	4.4	±	3.9						
Mitsuda test positivity [‡]	31		96.9	< 0.0001	9		11.1						
mean induration (mm) ± SD	7.6	±	2.7	< 0.0001	1.2	±	2.3						
Nasal swab qPCR positivity	14		43.8	0.0007	61		75.3						
mean quantity (bacilli/reaction) nasal swab qPCR ± SD	2.3E+04	±	2.9E+04	< 0.0001	2.2E+07	±	8.2E+7						
Nasal biopsy qPCR positivity	15		46.9	0.0001	66		81.5						
mean quantity (bacilli/reaction) nasal biopsy qPCR ± SD	4.6E+04	±	7.5E+04	< 0.0001	5.0E+07	±	9.8E+07						
Blood qPCR positivity	1		3.1	0.0029	21		25.9						
mean quantity (bacilli/reaction) blood qPCR ± SD	2.8E+03	±	0	-	1.6E+04	±	2.1E+04						
Skin biopsy qPCR positivity	3		9.4	< 0.0001	60		74.1						
mean quantity (bacilli/reaction) skin biopsy qPCR ± SD	3.6E+03	±	1.1E+03	0.0260	7.3E+07	±	1.5E+08						
Skin smears qPCR positivity	2		6.2	< 0.0001	63		77.8						
mean quantity (bacilli/reaction) skin smears qPCR ± SD	2.0E+03	±	2.4E+02	0.0504	1.3E+08	±	2.4E+08						
	TT (n=15)		BT ^{PB} (n=17)		BT ^{MB} (n=28)		BB (n=16)		BL (n=19)		LL (n=18)		P-value
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
anti-PGL-I ELISA positivity [†]	1	6.7	2	11.8	14	50	16	100	19	100	18	100	< 0.0001
mean ELISA index ± SD	0.6 ± 0.5		0.8 ± 0.6		1.97 ± 2.3		4.2 ± 2.9		4.4 ± 3.2		8.2 ± 4.5		< 0.0001
Mitsuda test positivity [‡]	15	100	16	94.1	9	47.4	0	0	0	0	0	0	< 0.0001
mean Mitsuda (mm) ± SD	8.5 ± 2.5		6.6 ± 2.8		3.1 ± 3.2		0.5 ± 1.4		0 ± 0		0 ± 0		< 0.0001
Nasal swab qPCR positivity	6	40	8	47.1	11	39.3	13	81.3	19	100	18	100	< 0.0001
mean quantity (bacilli/reaction) nasal swab qPCR ± SD	1.8E+4		3.3E+4		2.4E+4		1.2E+5		2.6E+7		4.9E+7		< 0.0001
Nasal biopsy qPCR positivity	8	53.3	7	41.2	16	57.1	13	81.3	19	100	18	100	< 0.0001
mean quantity (bacilli/reaction) nasal biopsy qPCR ± SD	8.0E+3		9.0E+4		2.5E+5		1.1E+7		8.0E+07		9.2E+7		< 0.0001
Blood qPCR positivity	1	6.7	0	0	2	7.1	0	0	8	42.1	11	61.1	< 0.0001
mean quantity (bacilli/reaction) blood qPCR ± SD	2.8E+3		0		2.7E+3		0		9.5E+3		2.3E+4		< 0.0001
Skin biopsy qPCR positivity	2	13.3	1	5.9	11	39.3	14	87.5	17	89.5	18	100	< 0.0001
mean quantity (bacilli/reaction) skin biopsy qPCR ± SD	3.8E+3		3.3E+3		1.7E+4		1.7E+7		4.1E+7		1.9E+8		< 0.0001
Skin smears qPCR positivity	1	6.7	1	5.9	10	35.7	16	100	19	100	18	100	< 0.0001
mean quantity (bacilli/reaction) skin smears qPCR ± SD	1.9E+3		2.2E+3		8.3E+3		1.1E+7		1.5E+8		2.9E+8		< 0.0001

Note: PB: Paucibacillary; MB: Multibacillary; TT: tuberculoid; BT: borderline-tuberculoid; BB: mid-borderline; BL: borderline-lepromatous; LL: lepromatous leprosy; SD = Standard deviation. [†] For anti-PGL-I, considered positive result: ELISA index ≥ 1.1. [‡] For Mitsuda test, considered positive result: node ≥ 7 mm. Patients under corticoid or other interfering treatment were excluded from positivity calculations. P-value for the statistical comparison of two proportions (Z-test), two means (Mann-Whitney), six proportions (Monte Carlo), and six means (Kruskal-Wallis).

Table 2. Statistical coefficients' obtained from pairwise analysis of leprosy patients tests results.

Continuous variables	Statistical coefficients	anti-PGL-I ELISA	qPCR nasal swab	qPCR nasal biopsy	qPCR blood	qPCR skin biopsy
qPCR nasal swab	Spearman <i>r</i>	0.23				
	Kappa <i>k</i>	0.42				
	OR (95% CI)	6.6 (2.8 - 15.5)				
qPCR nasal biopsy	Spearman <i>r</i>	0.64	0.32			
	Kappa <i>k</i>	0.40	0.63			
	OR (95% CI)	6.7 (2.8 - 16.3)	24.9 (8.5 - 73.3)			
qPCR blood	Spearman <i>r</i>	0.37	0.10	0.45		
	Kappa <i>k</i>	0.19	0.19	0.17		
	OR (95% CI)	7.8 (2.0 - 31.1)	14.4 (2.6 - 79.3)	positive infinity		
qPCR skin biopsy	Spearman <i>r</i>	0.69	0.27	0.67	0.45	
	Kappa <i>k</i>	0.60	0.30	0.33	0.29	
	OR (95% CI)	18.7 (7.1 - 49.1)	3.8 (1.7 - 8.7)	5.1 (2.1 - 12.3)	24.5 (4.5 - 135)	
qPCR skin smears	Spearman <i>r</i>	0.76	0.26	0.74	0.46	0.85
	Kappa <i>k</i>	0.63	0.48	0.38	0.24	0.75
	OR (95% CI)	22.3 (8.3 - 59.7)	9.5 (3.9 - 23.2)	7.1 (2.9 - 16.3)	10.2 (2.6 - 40.4)	49.9 (16.7 - 141)

Figure 1. Graphical display of the multivariate exploration of leprosy patients' data through multiple correspondence analysis (MCA).



Note: PB: Paucibacillary; MB: Multibacillary; TT: tuberculoid; BT: borderline-tuberculoid; BB: mid-borderline; BL: borderline-lepromatous; LL: lepromatous leprosy.

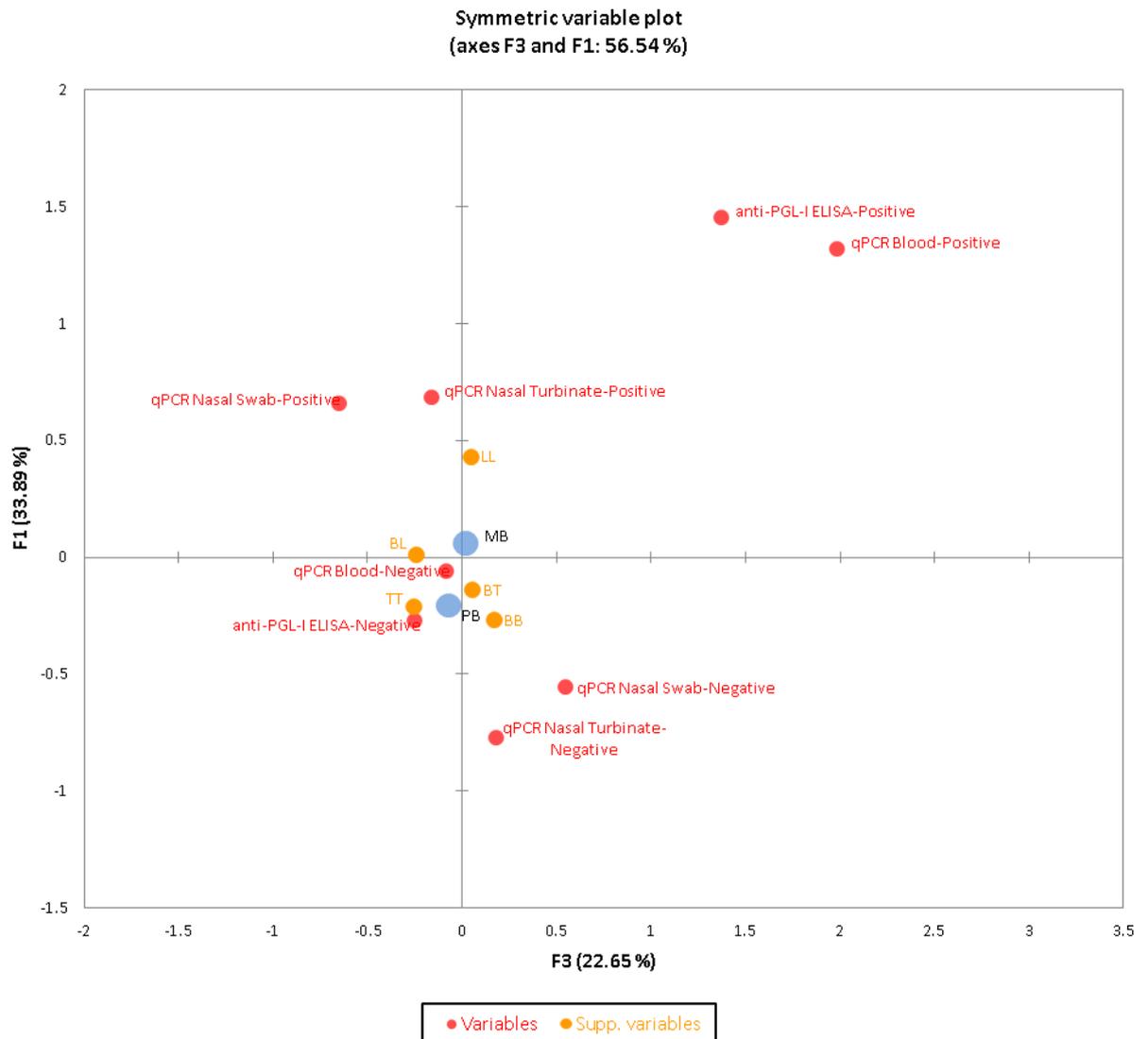
Table 3. Laboratory tests frequency according to the operational and clinical classifications of the index cases of the household contacts.

Laboratory tests	Household Contacts (n=104)												
	Operational and Clinical Classification of Index Case												
	PB (n=23)				P-value	MB (n=81)							
	N		%			N		%		N		%	
anti-PGL-I ELISA positivity [†]	2		8.7		0.2001	17		21					
mean ELISA index ± SD	0.5 ± 0.5		0.0037			0.8 ± 0.7							
Mitsuda test positivity [‡]	18		78.3		0.1760	50		61.7					
mean induration (mm) ± SD	7.7 ± 3.1		0.8348			8.2 ± 4.0							
Nasal swab qPCR positivity	9		39.1		0.3916	42		51.8					
mean quantity (bacilli/reaction) nasal swab qPCR ± SD	9.3E+03 ± 1.3E+04		0.1862			2.0E+04 ± 3.0E+04							
Nasal biopsy qPCR positivity	13		56.5		0.9562	43		53.0					
mean quantity (bacilli/reaction) nasal biopsy qPCR ± SD	6.4E+04 ± 1.4E+05		0.421			1.5E+05 ± 4.6E+05							
Blood qPCR positivity	2		8.7		1	5		6.2					
mean quantity (bacilli/reaction) blood qPCR ± SD	1.2E+04 ± 1.3E+04		0.4562			1.4E+04 ± 1.7E+04							
	TT (n=3)		BT ^{PB} (n=20)		BT ^{MB} (n=20)		BB (n=16)		BL (n=19)		LL (n=26)		P-value
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
anti-PGL-I ELISA positivity [†]	0	0	2	10	3	15	3	18.7	2	10.5	9	34.6	0.2168
mean ELISA index ± SD	0.4 ± 0.2		0.5 ± 0.6		0.7 ± 0.5		0.75 ± 0.8		0.6 ± 0.4		1.0 ± 0.8		0.0455
Mitsuda test positivity [‡]	3	100	15	75	10	50	12	75	14	73.7	14	53.8	0.2021
mean Mitsuda (mm) ± SD	11 ± 3.6		7.3 ± 2.8		7.5 ± 3.5		7.9 ± 3.2		9.6 ± 5.0		7.9 ± 4.0		0.3078
Nasal swab qPCR positivity	1	33.3	8	40	8	40	7	43.7	9	47.4	18	69.2	0.3020
mean quantity (bacilli/reaction) nasal swab qPCR	1.5E+04		2.0E+03		3.1E+03		1.5E+03		5.8E+03		2.5E+04		0.0200
Nasal biopsy qPCR positivity	2	66.7	11	55	11	55	6	37.5	12	63.2	14	53.8	0.7740
mean quantity (bacilli/reaction) nasal biopsy qPCR	1.8E+05		1.5E+04		1.2E+04		1.8E+05		8.2E+04		6.1E+04		0.5037
Blood qPCR positivity	0	0	2	10	2	10	2	12.5	0	0	1	3.8	0.6362
mean quantity (bacilli/reaction) blood qPCR	0		1.2E+03		3.8E+02		3.9E+03		0		2.5E+03		0.6104

Note: Operational and clinical classifications of the index case of the household contact. PB: Paucibacillary; MB: Multibacillary; TT: tuberculoid; BT: borderline-tuberculoid; BB: mid-borderline; BL: borderline-lepromatous; LL: lepromatous leprosy; SD = Standard deviation. [†] For anti-PGL-I, considered positive result: ELISA index ≥ 1.1. [‡] For Mitsuda test, considered positive result: node ≥ 7 mm. Patients under corticoid or other interfering treatment were excluded from positivity calculations.

P-value for statistical comparison of two proportions (Z-test), two means (Mann-Whitney), six proportions (Monte Carlo), and six means (Kruskal-Wallis).

Figure 2. Graphical display of the multivariate exploration of data of household contacts of leprosy patients through multiple correspondence analysis (MCA). Clinical and operational classifications are related to the index case of the contact.



Note: Operational and clinical classifications of the index case of the household contact. PB: Paucibacillary; MB: Multibacillary; TT: tuberculoid; BT: borderline-tuberculoid; BB: mid-borderline; BL: borderline-lepromatous; LL: lepromatous leprosy.

Table 4. Assessment of results for qPCR, anti-PGL-I ELISA, and Mitsuda tests based on the positivity at the time of diagnosis of the index case, observed in healthy household contacts (n=97) in comparison to those contacts that were affected by leprosy (n=7).

Tests and follow-up outcome	No. of positives	No. of negatives	Diagnostic parameters	LR+ (CI _{95%})	RR (CI _{95%})
Nasal swab qPCR					
Affected	6	1	Sensitivity 85.7%	1.85 (1.28 - 2.68)	6.24 (0.78 - 50.03)
Healthy	45	52	Specificity 53.6%		
Nasal biopsy qPCR					
Affected	4	3	Sensitivity 57.1%	1.07 (0.55 - 2.08)	1.14 (0.27 - 4.86)
Healthy	52	45	Specificity 46.4%		
Blood qPCR					
Affected	2	5	Sensitivity 28.6%	5.54 (1.30 - 23.62)	5.54 (1.30 - 23.62)
Healthy	5	92	Specificity 94.9%		
Anti-PGL-I ELISA[†]					
Affected	4	3	Sensitivity 57.1%	3.69 (1.67 - 8.16)	5.97 (1.45 - 24.5)
Healthy	15	82	Specificity 84.5%		
Mitsuda test[‡]					
Affected	2	5	Sensitivity 28.6%	2.24 ^a (1.29 - 3.88)	0.21 (0.04 - 1.04)
Healthy	66	31	Specificity 31.96%		

NOTE: LR+: Positive Likelihood Ratio.

RR: Relative Risk.

[†] For anti-PGL-I, considered positive result: ELISA index ≥ 1.1

[‡] For Mitsuda test, considered positive result: node ≥ 7 mm.

^a Negative Likelihood Ratio

Supplementary data

Table 5. Relationship between qualitative results observed among leprosy patients, healthy household contacts of leprosy patients, and those affected by disease during follow-up.

qPCR Nasal Swab	qPCR Nasal Turbinates	qPCR Blood	anti- PGL-I ELISA	Leprosy patients						Household contacts			
				Total (n=113)		MB (n=81)		PB (n=32)		Healthy (n=97)		Affected (n=7)	
				N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
-	-	-	-	18	15.9	6	7.4	12	37.5	26	26.8	0	-
+	-	-	-	4	3.5	1	1.2	3	9.4	14	14.4	1	14.3
+	+	-	-	12	10.6	2	2.5	10	31.3	20	20.6	1	14.3
-	+	-	-	6	5.3	3	3.7	3	9.4	18	18.6	1	14.3
+	+	+	-	1	0.9	1	1.2	0	-	2	2.1	0	-
-	+	+	-	1	0.9	0	-	1	3.1	0	-	0	-
+	-	+	-	0	0	0	-	0	-	1	1	0	-
-	-	+	-	0	0	0	-	0	-	1	1	0	-
+	-	-	+	2	1.8	2	2.5	0	-	1	1	2	28.5
+	+	-	+	36	31.9	35	43.2	1	3.1	6	6.2	0	-
-	+	-	+	5	4.4	5	6.2	0	-	5	5.2	0	-
+	+	+	+	20	17.7	20	24.7	0	-	1	1	2	28.5
-	+	+	+	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
+	-	+	+	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
-	-	+	+	0	0	0	-	0	-	0	-	0	-
-	-	-	+	8	7.1	6	7.4	2	6.2	2	2.1	0	-

Note: + = Positive result; - = Negative result. PB: Paucibacillary; MB: Multibacillary leprosy.

References

1. Global leprosy update, 2014: need for early case detection. *Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2015; 90(36): 461-74.
2. Araujo S, Lobato J, Reis Ede M, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 2012; 107 Suppl 1: 55-9.
3. Reis EM, Araujo S, Lobato J, et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014; 20(5): 447-52.
4. Sharma R, Singh P, Loughry WJ, et al. Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerging infectious diseases* 2015; 21(12): 2127-34.
5. Goulart IM, Araujo S, Filho AB, de Paiva PH, Goulart LR. Asymptomatic Leprosy Infection among Blood Donors May Predict Disease Development and Suggests a Potential Mode of Transmission. *Journal of clinical microbiology* 2015; 53(10): 3345-8.
6. Mohanty PS, Naaz F, Katara D, et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology* 2016; 82(1): 23-7.
7. Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Goncalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clinical and vaccine immunology : CVI* 2008; 15(1): 101-5.
8. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews* 2006; 19(2): 338-81.
9. Sharma R, Lahiri R, Scollard DM, et al. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Disease models & mechanisms* 2013; 6(1): 19-24.
10. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS neglected tropical diseases* 2008; 2(11): e328.
11. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS neglected tropical diseases* 2014; 8(4): e2655.
12. Patrocinio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocinio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS immunology and medical microbiology* 2005; 44(3): 311-6.
13. Goulart LR, Goulart IM. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. *Archives of dermatological research* 2009; 301(2): 123-37.
14. Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Leprosy review* 2011; 82(4): 389-401.
15. Goulart IM, Cardoso AM, Santos MS, Goncalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Archives of dermatological research* 2007; 299(5-6): 267-71.
16. Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Goncalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2011; 17(11): 1653-8.
17. Naves Mde M, Ribeiro FA, Patrocinio LG, Patrocinio JA, Fleury RN, Goulart IM. Bacterial load in the nose and its correlation to the immune response in leprosy patients. *Leprosy review* 2013; 84(1): 85-91.
18. Silva CA, Danelishvili L, McNamara M, et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. *Infection and immunity* 2013; 81(7): 2645-59.
19. Masaki T, McGlinchey A, Cholewa-Waclaw J, Qu J, Tomlinson SR, Rambukkana A. Innate immune response precedes *Mycobacterium leprae*-induced reprogramming of adult Schwann cells. *Cellular reprogramming* 2014; 16(1): 9-17.
20. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. [Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2002; 35(4): 365-75.
21. Araujo S, Rezende MM, Sousa DC, et al. Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guerin 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): 739-45.

ANEXO I – ATA DA DEFESA DE TESE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 FACULDADE DE MEDICINA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de Tese de Doutorado N° 002/PPCSA

Área de concentração: Ciências da Saúde

Linha de Pesquisa 1: Epidemiologia da ocorrência de doenças e agravos à saúde.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Apoio às ações de eliminação da hanseníase.

Discente: **SÉRGIO ARAÚJO** – Matrícula n° 11213CSD011

Título do Trabalho: **"Evidências moleculares da via aérea de infecção de *Micobacterium leprae* e implicações na cadeia de transmissão da hanseníase."** Às 14:00 horas do dia 29 de fevereiro do ano de 2016, no anfiteatro do Bloco 8B – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, assim composta: Professores Doutores: Patrícia Sammarco Rosa (ILSL-SP), Marco Andrey Cipriani Frade (FMRP-USP), Denise Von Dolinger de Brito Röder (UFU), David Nascimento Silva Teixeira (UFTM) e Isabela Maria Bernardes Goulart (UFU) – orientadora do discente. Iniciando os trabalhos, a presidente da mesa o Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart apresentou a Comissão Examinadora e ao discente, agradeceu a presença do público e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A seguir a senhora presidente concedeu a palavra aos examinadores que passaram a argüir o candidato. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, em sessão secreta, em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato aprovado. Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU, em especial do artigo 55 da resolução 12/2008 do Conselho de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18:00 horas. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Profa. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart

Profa. Dra. Patrícia Sammarco Rosa

Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Profa. Dra. Denise Von Dolinger de Brito Röder

Prof. Dr. David Nascimento Silva Teixeira

