

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:
Infectologia e Medicina Tropical

Geise Cristine Espíndola

**AVALIAÇÃO DE QUIMERA ANTIGÊNICA UTILIZANDO URINA PARA O
DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE**

Belo Horizonte

2024

Geise Cristine Espíndola

**AVALIAÇÃO DE QUIMERA ANTIGÊNICA UTILIZANDO URINA PARA O
DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadores:

Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

Profa. Dra. Ana Thereza Chaves Lages

Coorientador:

Prof. Dr. Ricardo Luiz Fontes Moreira

Belo Horizonte

2024

ES77a Espíndola, Geise Cristine.
Avaliação de Quimera Antigênica utilizando urina para o diagnóstico da Hanseníase [recurso eletrônico]. / Geise Cristine Espíndola. - - Belo Horizonte: 2024.

111f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Eduardo Antonio Ferraz Coelho; Ana Thereza Chaves Lages.

Coorientador (a): Ricardo Luiz Fontes Moreira.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Proteínas Recombinantes de Fusão. 3. Diagnóstico. 4. Urina. 5. Tratamento Conservador. 6. Dissertação Acadêmica. I. Coelho, Eduardo Antonio Ferraz. II. Lages, Ana Thereza Chaves. III. Moreira, Ricardo Luiz Fontes. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WC 335

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos onze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte e quatro (11/12/2024), às 09:00 (nove) horas, no Canal do CETES - Plataforma LIFESIZE, realizou-se a sessão pública para a 460ª defesa de dissertação de GEISE CRISTINE ESPÍNDOLA, número de registro 2022709874, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL. A presidência da sessão coube ao professor EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO, orientador. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - ORIENTADOR (UFMG), DRA. ANA THEREZA CHAVES – ORIENTAÇÃO DUPLA (UFMG), PROF. RICARDO LUIZ FONTES MOREIRA - COORIENTADOR (FAMINAS), DRA. BÁRBARA PROENÇA NARDI ASSIS (FHEMIG), DRA. FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO (UFMG). Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua dissertação de Mestrado, intitulada: *"Avaliação de quimera antigênica utilizando urina para o diagnóstico da hanseníase"*. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e, logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público, e decidiu considerar a dissertação APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. A aluna e os membros da banca estão cientes e autorizaram a gravação desta defesa, que ficará disponibilizada em acervo da Universidade. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão, sendo lavrada a presente ata que, depois de lida e aprovada, foi assinada eletronicamente por todos os membros titulares da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 11 de dezembro de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Bárbara Proença Nardi Assis, Usuária Externa, em 11/12/2024, às 12:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ana Thereza Chaves Lages, Usuário Externo, em 11/12/2024, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Ricardo Luiz Fontes Moreira, Usuário Externo, em 11/12/2024, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por FERNANDA LUDOLF RIBEIRO DE MELO, Usuário Externo, em 11/12/2024, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

Dedico esta dissertação, primeiramente, ao nosso Criador por ter me permitido chegar até aqui e a minha família. E dedico este trabalho as pessoas afetadas pela hanseníase e por todos os outros meus pacientes que precisam de um olhar empático e pautado em ciência para ajudá-los em todas as fases do adoecimento, desde o diagnóstico até o manejo da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me direcionar em todas as fases da minha vida, por me permitir passar por esta experiência acadêmica. O Senhor faz maravilhas na minha vida e tem me dado muito mais do que eu peço. Jesus, sou completamente grata por todas as bênçãos que recebo e espero ser merecedora de todo seu amor e zelo.

Agradeço ao meu esposo Elder pelo companherismo. Obrigada por me incentivar e pela positividade de sempre. Gratidão a minha mãe, por ser razão da minha existência e ao meu pai (*in memoriam*) por me inspirar a buscar os meus sonhos. Agradeço a minha filha Ísis, ainda no meu ventre, que já me ensina a ser forte e não desistir.

Ao meu orientador Professor Dr Eduardo Antonio Ferraz Coelho, que direcionou todas as fases do projeto e da pesquisa. À minha orientadora, Professora Dra Ana Thereza Chaves Lages, por estar comigo em todas as fases de desenvolvimento do meu trabalho e pelas valiosas orientações e ensinamentos. Ao meu co-orientador Professor Dr Ricardo Luiz Fontes Moreira, pelas orientações, conselhos e direcionamentos.

Agradeço aos meus colaboradores que foram fundamentais para a realização deste projeto. A Dra Bárbara Proença Nardi Assis, por me inspirar desde a residência médica a voltar-se para a ciência e para área de hansenologia. Aos funcionários do Hospital Eduardo de Menezes, que me acolheram tão bem desde a residência médica até durante as coletas das amostras biológicas dos pacientes, durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa de mestrado na pós-graduação. A Dra Sandra Lyon por me inspirar e incentivar, continuar me apoiando na pós-graduação e fornecer alguns materiais para que fosse possível a realização as coletas. A Dra Rozana Castorina, por colaborar na realização do projeto. Agradeço Luciana Paione, coordenadora do ambulatório, que autorizou as coletas e sempre solícita e auxiliando a resolver os desafios. Aos preceptores e residentes do Hospital, que ajudaram no recrutamento dos pacientes.

Um agradecimento especial à equipe de Januária, a médica hansenóloga, Laís Almeida, uma amiga e uma peça fundamental no desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela sua dedicação e apoio que me deu. À Ingrid, técnica de enfermagem, tão competente e cuidadosa também nas coletas e planilhamentos.

Ao laboratório LIMT-Medicina, especialmente, Raquel Soares Bandeira Câmara e Isabela Amorim Gonçalves Pereira, pela realização dos experimentos. Agradeço a paciência e dedicação de vocês, que foram fundamentais.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina UFMG por permitir esta experiência e aos professores, secretária da pós-graduação e colegas por ter compartilhado o conhecimento e ter contruído para o meu crescimento profissional e pessoal ao longo desses dois anos.

Aos órgãos financiadores FAPEMIG, CNPq e CAPES, que proporcionaram a realização deste projeto.

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”.

Sócrates

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que cursa com neuropatias em graus variados. A doença pode causar incapacidade física e perda funcional. Embora progressos significativos tenham sido feitos no controle da doença; desafios permanecem, particularmente, em relação ao diagnóstico tardio. Testes menos onerosos, de fácil execução e acessíveis em regiões mais carentes poderiam contribuir no controle da doença. Este estudo utilizou a urina de pacientes, como amostra biológica e teve como objetivo avaliar a reação de anticorpos presentes na urina para diagnóstico de hanseníase por meio de ELISA com proteína quimérica. Foram coletadas amostras pareadas de soro e urina de 310 indivíduos: pessoas saudáveis sem comorbidades (n=55), doentes paucibacilares (n=25), doentes multibacilares (n=35), contatos de paucibacilares (n=30), contatos de multibacilares (n=35), e pacientes com outras doenças infecciosas (n=130). Quatro peptídeos sintéticos, que foram usados na construção da quimera, mostraram resultados preliminares promissores com uso de menor painel de amostras, principalmente, na detecção dos casos multibacilares. O uso da quimera recombinante no soro e na urina mostrou valores de sensibilidade e especificidade de 100% para diferenciar o grupo de pacientes daqueles de indivíduos saudáveis e de pacientes com outras doenças infecciosas, com valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) de 100%. Usando soro, a sensibilidade e especificidade para diferenciar pacientes com hanseníase de seus contatos foi de 94,2% e 100%, respectivamente. Usando urina, os valores foram de 97,0% e 100%, respectivamente. Além disso, o VPN foi de 97% na urina e 93,3% no soro. Em conclusão, resultados preliminares sugerem que a urina dos pacientes com hanseníase apresentou valores de sensibilidade e VPN ligeiramente melhores em relação ao uso do soro, indicando que esse analito biológico menos invasivo poderia ser considerado em estudos futuros para uso em ferramentas diagnósticas de detecção das formas clínicas paucibacilar e multibacilar da doença.

Palavras-chave: Hanseníase; proteína quimérica; diagnóstico; teste não invasivo; urina; soro.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease that causes neuropathy from variable degrees. The disease can cause physical disability and functional loss. Although significant progress has been made in controlling the disease, challenges remain, particularly regarding late diagnosis. Less expensive, easy-to-perform tests that are accessible in poorer regions could contribute to controlling better the disease. This study aimed to evaluate patients urine by Indirect ELISA as a biological sample for laboratory diagnosis of leprosy, by using a recombinant chimeric protein previously evaluated using patient serum. Paired serum and urine samples were collected from 310 individuals: healthy individuals without comorbidities (n=55), paucibacillary patients (n=25), multibacillary patients (n=35), contacts of paucibacillary patients (n=30), contacts of multibacillary patients (n=35), and patients with other infectious diseases (n=130). Four synthetic peptides, which were used for the construction of the chimera, showed promising preliminary results with the use of a smaller sample panel, mainly in the detection of multibacillary cases. The use of the recombinant chimera showed sensitivity and specificity values of 100% to differentiate the patients group from those of healthy individuals and patients with other infectious diseases, with positive predictive values (PPV) and negative predictive values (NPV) both of 100%. Using serum; sensitivity and specificity to differentiate leprosy patients from their contacts was 94.2% and 100%, respectively. Using urine; values were 97.0% and 100%, respectively. In addition, NPV was 97% in urine and 93.3% in serum. In conclusion, preliminary data suggest that urine from leprosy patients presented slightly better sensitivity and NPV values compared to the use of serum, indicating that this less invasive biological analyte could be considered in future studies for use in diagnostic tools for detecting paucibacillary and multibacillary clinical forms of the disease.

Keywords: Leprosy; chimeric protein; diagnosis; non invasive test; urine; serum.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proporção de casos novos de hanseníase avaliados quanto ao grau de incapacidade física no momento do diagnóstico – Brasil, 2013 a 2022	21
Figura 2 - Proporção de casos novos de hanseníase em menores de 15 anos avaliados quanto ao grau de incapacidade física no momento do diagnóstico – Brasil, 2013 a 2022	22
Figura 3 - História natural da Hanseníase	24
Figura 4 - Sequência de aminoácidos das quatro regiões epitópicas selecionadas para compor a proteína quimérica M1, provenientes das proteínas ML0369, ML0447, ML0959 e ML2346	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificações da hanseníase e correlações	27
Tabela 2 - Indivíduos acometidos pela doença e suas diferentes formas clínicas.....	51
Tabela 3 - Número de amostras por categoria de grupos controle do estudo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APS	Atenção Primária à Saúde
Anti LID-1	Anticorpo contra o antígeno de fusão <i>Leprosy IDR1 diagnostic 1</i> , um antígeno sintético.
Anti PGL-1	Anticorpo contra o antígeno PGL-1
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BSA	Albumina de soro bovino
CEDRI	Centro Especializado em Doenças Respiratórias e Infectocontagiosas
CMB	Contatos Multibacilares
CPB	Contatos Paucibacilares
DD	Dimorfa Dimorfa
DO	Densidade Óptica
Dot-ELISA	Reação imunoenzimática sobre membranas
DT	Dimorfa Tuberculoide
DV	Dimorfa Virchowiana
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima)
GIF	Grau de incapacidade física
GLY	Glicina
HE	Hematoxilina-eosina
HEM	Hospital Eduardo de Menezes
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IB	Índice baciloscópico
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	Isopropil β -D-Tiogalactopiranosídeo
ITU	Infecção do Trato Urinário
kDa	Kilodalton
LT	Leishmaniose Tegumentar
LDH	Desidrogenase láctica
LV	Leishmaniose Visceral
LYS	Lisina
MAC	Complexo <i>Mycobacterium avium</i>
MB	Multibacilar
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo de Histocompatibilidade)
Min	Minutos

mL	Mililitro
ML Flow	Teste rápido de fluxo lateral
MLPA	Teste de aglutinação com partícula de gelatina
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
n	Número
NaN ₃	Azida sódica
NDO-LID	<i>natural dissacarídeo ligado ao radical octil</i>
nm	Nanômetro
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
OD	<i>Optical Density</i> (Densidade óptica)
OMP	Olhos, mãos e pés
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paucibacilar
PBS-T	<i>Phosphate-buffered saline added Tween 20</i> (Solução salina tamponada com fosfato com Tween®-20)
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGL-1	Antígeno glicolípídeo-fenólico 1
pl	Ponto isoelétrico
PM	Peso molecular
POC	<i>Point-of-care</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PHA	Teste de hemaglutinação passiva
PQT-U	Poliquimioterapia
PPGIMT	Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
rDNA	DNA ribossômico
RAM	Reação adversa a medicamento
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
Rlep PCR	<i>Amplification of DNA by PCR</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
s	Segundo
Se	Sensibilidade
SFM	Sistema Fagocítico-Mononuclear
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TES	Trietilsilano
TFA	Ácido trifluoracético
TLR	Receptores <i>Toll-Like</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina linear
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TT	Tuberculoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VV	Virchowiano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 CONTEXTO	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE.....	21
2.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO DA HANSENÍASE	23
2.4 IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE	24
2.5 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE	26
2.6 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA	27
2.6.1 Diagnóstico clínico	27
2.6.2 Diagnóstico histológico	28
2.6.3 Baciloscopia	29
2.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	29
2.6.5 Testes sorológicos	30
2.6.6 Proteômica	34
2.7 AMOSTRAS BIOLÓGICAS NÃO INVASIVAS.....	36
2.7.1 Urina na detecção de anticorpos.....	38
2.7.2 Urina no diagnóstico da hanseníase.....	40
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	43
4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	43
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	44
4.3.1 Pacientes	44
4.3.1.1. Critérios de inclusão.....	44
4.3.1.2. Critérios de exclusão.....	44
4.3.1.3. Diagnóstico e classificação da doença	44
4.3.2 Controles.....	46
4.4 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	47

4.5	ELISA.....	48
4.5.1	ELISA usando soro	48
4.5.2	ELISA usando urina.....	49
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5	RESULTADOS.....	51
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7	CONCLUSÃO	75
	PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICES	90
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA PARA PACIENTES ...	90
	APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA PARA CONTROLES	93
	ANEXOS	96
	ANEXO 1 – PARECER CONSUSBTANCIADO DO CEP	96
	ANEXO 2 – PARECER 2 CONSUSBTANCIADO DO CEP.....	102

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela bactéria intracelular *Mycobacterium leprae*, que afeta nervos periféricos e a pele dos pacientes, mas pode atingir órgãos internos, além da mucosa do trato respiratório superior, linfonodos, olhos e testículos. A doença cursa como uma neuropatia em grau variado, podendo causar incapacidade física e perda funcional, especialmente nos olhos, nas mãos e nos pés, que podem ser mais graves nos casos de diagnóstico tardio (Britton; Lockwood, 2004).

A epidemiologia da hanseníase revela um cenário complexo. Embora progressos significativos no controle da doença tenham sido feitos, os desafios permanecem, particularmente em regiões endêmicas. Em 2023, foram registrados 182.815 novos casos da doença, um aumento de 5,0% em relação a 2022. Índia, Brasil e Indonésia concentraram 79,3% desses casos. Entre crianças menores de 15 anos, foram detectados 10.322 casos, indicando transmissão ativa (Brasil, 2024). Em 2023, houve aumento de 48,5% nos casos com grau 1 e de 69,7% nos com grau 2 de incapacidade física no diagnóstico, em comparação a 2014. Esse indicador reporta a presença de deficiências visíveis em mãos, pés ou olhos no momento do diagnóstico e representa o atraso na detecção da doença no país (Brasil, 2024).

As causas para a demora no diagnóstico podem incluir a falta de capacidade técnica no diagnóstico, a ausência de um teste no local do atendimento para detectar a infecção ou doença ativa, os deficientes programas de detecção de casos e de rastreio de contatos, a falta de sensibilização da comunidade e o estigma associado com a doença (WHO, 2021a). O diagnóstico da hanseníase permanece essencialmente clínico, porém, é desafiador. Há um polimorfismo de manifestações clínicas da doença devido à sua complexidade, da interação e resposta imunológica entre o hospedeiro e patógeno (Ridley; Jopling, 1966). Além disso, os critérios clínicos adotados têm especificidade limitada, gerando diagnósticos falso-positivos e falso-negativos (Gurung *et al.*, 2019).

A melhora da abordagem clínica com testes diagnósticos, especialmente nos casos oligossintomáticos, iniciais e paucibacilares (PB) devem fazer parte da pesquisa em hanseníase, uma vez que a falta de um exame de alta acurácia contribui para o atraso no diagnóstico que, quando tardio, acarreta continuidade na cadeia de transmissão e aumento do risco de incapacidades (Deps; Florian; Virmond, 2022;

WHO, 2021b; Brasil, 2022). A histopatologia da biópsia de pele e a baciloscopia da raspagem intradérmica são testes diagnósticos subsidiários que exigem experiência e infraestrutura laboratorial (Lopes-Luz *et al.*, 2023). Embora com alta especificidade, a baciloscopia possui baixa sensibilidade, principalmente, nas formas PB, com sensibilidade de 24,5% (Lima *et al.*, 2022). A reação em cadeia da polimerase (PCR), incluindo a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), é altamente sensível e específica para detectar o DNA do *M. leprae*. A qPCR demonstrou sensibilidade de 93,1% e especificidade de 100% ao usar a histopatologia como padrão-ouro (Sarath; Joseph; Jamir, 2023). Os ensaios de qPCR em tempo real de biópsia também demonstraram alta sensibilidade diagnóstica (91%) e especificidade (100%), porém, a técnica é onerosa e necessita de estrutura especializada (Manta *et al.* 2022), além de valor de sensibilidade inferior para os casos paucibacilares (Barbieri *et al.*, 2019).

Há testes sorológicos para detecção da hanseníase, incluindo o teste *ML Flow*, que tem alta sensibilidade (98,1%), mas menor especificidade (80%). Os testes NDO-LID e de ELISA usando o glicolípido fenólico-1 (anti-PGL-1) são precisos para detecção da hanseníase em sua forma multibacilar (MB), mas não para os casos da doença PB. As limitações incluem o potencial de falso-positivos em indivíduos previamente expostos ou vacinados e a necessidade de exames adicionais para confirmar o diagnóstico devido às diferentes respostas imunes entre os mesmos (Arthaningsih; Margha, 2023). Testes que detectam anticorpos IgM contra PGL-1 por ELISA têm sensibilidade de 63,8% e especificidade de 91,0%. Testes sorológicos rápidos no local de atendimento, como NDO-LID e PGL-1, mostram alta sensibilidade e especificidade em pacientes MB, com valores em torno de 83-92% para sensibilidade e 91-93% para especificidade, mas os casos PB permanecem com valores menores de detecção (Gurung *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2022).

Pesquisas usando ferramentas como proteômica e genômica têm sido realizadas para identificar antígenos promissores para o diagnóstico de doenças, como a hanseníase (Marques *et al.*, 2004; Marques *et al.*, 2008; Wiker; Tomazella; Souza, 2011; Parkash; Singh, 2012). Uma proteína quimérica denominada M1, composta de epítopos específicos de células B derivados de proteínas do *M. leprae*, foi analisada no soro de pacientes com hanseníase MB e PB, e apresentou bom desempenho diagnóstico (Assis *et al.*, 2024). A especificidade da proteína M1 foi de 100% tanto para detecção de casos MB quanto para casos PB, quando os resultados de ambas as classificações foram comparados com resultados dos controles sem a

doença. A sensibilidade e especificidade da quimera M1 foi de 100% quando comparado os casos de ambas as classificações com os controles sem doença (Assis *et al.*, 2024).

Além disso, amostras biológicas diferentes têm sido testadas para tornar exames diagnósticos mais simples e menos onerosos. Os testes de ELISA utilizando urina oferecem vantagens em relação aos ensaios baseados em soro no diagnóstico de doenças infecciosas, como observado em alguns trabalhos (Eamudomkarn, 2018; Nagaoka, 2021; Chungkanchana, 2022; Ludolf *et al.*, 2022; Camara *et al.*, 2024). A coleta do soro é considerada de difícil execução em recém-nascidos e crianças, bem como em pessoas obesas e com fobias de agulhas e sangue, além dos locais sem estrutura laboratorial. Ademais, há risco de infecções incidentais.

Desde a década de 1980, antígenos e anticorpos têm sido detectados na urina (Kaldany, 1986; Olcen, 1983; Singh, 1988). Há relatos de detecção de antígenos específicos de *M. leprae*, incluindo PGL-1, em amostras de urina de pacientes com hanseníase usando um método de dot-ELISA (Parkash; Singh, 1991), assim como a detecção do antígeno da parede celular de *M. leprae* na urina de pacientes com hanseníase, tendo sido tratados ou não tratados (Sharma *et al.*, 1992). A técnica de PCR para detectar DNA de *M. leprae* em amostras de urina também foi descrita (Caleffi, 2012; David, 2024). Portanto, é indispensável a exploração nesse campo.

Assim, o presente estudo visa avaliar a urina como uma possível amostra biológica viável para o diagnóstico em hanseníase utilizando a proteína quimérica M1 já testada em soro em trabalhos prévios (Assis *et al.*, 2024). Além disso, objetiva-se comparar o desempenho da proteína no soro em relação à urina. Este é um estudo pioneiro e inovador na análise da proteína quimérica por meio de ELISA utilizando amostras de urina dos pacientes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTEXTO

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *M. leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente de multiplicação lenta e não cultivável *in vitro*, apesar das inúmeras tentativas realizadas desde a sua descoberta até os dias atuais (Brasil, 2022). Diante disso, torna-se ainda mais difícil estudos sobre a composição, o metabolismo e a genética do bacilo (Brennan, 2019). Há lacunas importantes em relação aos vários aspectos epidemiológicos, patológicos e imunológicos em relação à doença. Embora uma segunda espécie de micobactéria tenha sido identificada, o *Mycobacterium lepromatosis*, são necessários mais estudos para a melhor compreensão desse outro patógeno causador da doença (Deps; Collin, 2021). O *M. leprae* acomete, principalmente, os nervos periféricos e a pele, porém, pode atingir a mucosa do trato respiratório superior, olhos, linfonodos, testículos e órgãos internos, de acordo com o grau de resposta imune do indivíduo infectado (Brasil, 2022). A doença cursa com neuropatia em graus variados, podendo causar incapacidade física e perdas funcionais permanentes (Khadilkar, 2021; Marques, 2024).

Fatores imunogenéticos e individuais de adoecimento contribuem para diversidades das apresentações clínicas da doença. Além disso, indivíduos que residem em regiões com altos níveis de pobreza têm um risco significativamente maior de contrair hanseníase. Fatores como pouca renda, baixa educação e condições de vida inadequadas estão associados ao aumento do risco de hanseníase (Wagenaar, 2015; Oktaria, 2018; Pescarini, 2018; Nery, 2019).

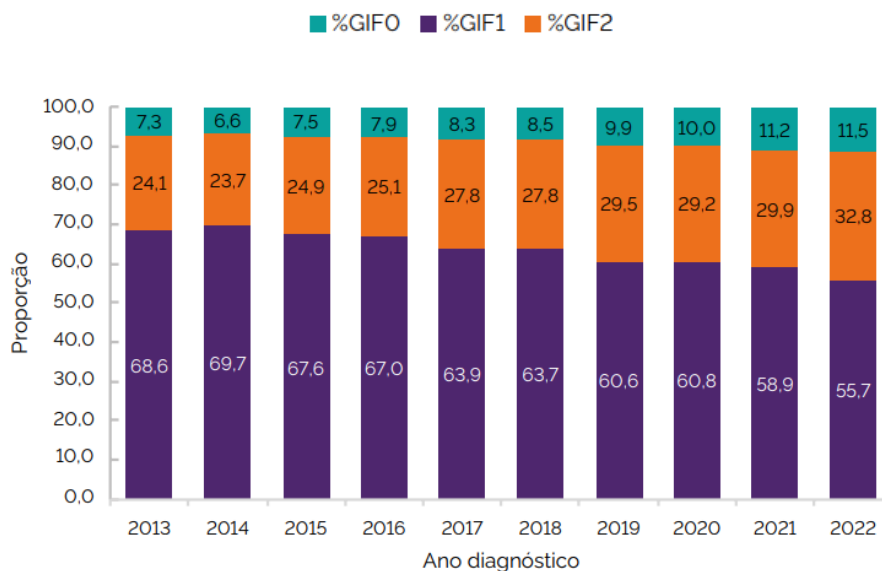
Portanto, a hanseníase é considerada uma doença negligenciada devido a uma combinação de fatores, incluindo transmissão contínua, disparidades socioeconômicas, resistência antimicrobiana e maior incidência em regiões empobrecidas. A mortalidade relacionada à hanseníase é maior entre homens, idosos e indivíduos de raça/cor negra, particularmente, em regiões endêmicas da doença e socioeconomicamente carentes (Martins-Melo *et al.*, 2015).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA HANSENÍASE

A hanseníase continua sendo um importante desafio de saúde pública no Brasil, um dos países com maior carga da doença. Devido à sua extensão territorial, o país apresenta diferentes níveis de endemicidade, demandando ações epidemiológicas específicas e integradas. Em 2023, o Brasil, entre os principais países prioritários, destacou-se com o segundo lugar em número de casos novos da doença (n=22.773), aumento de 16,0% em relação a 2022 (WHO, 2024).

A persistência de deformidades visíveis em pacientes com hanseníase, representada pelo GIF2, reflete a dificuldade em diagnosticar a doença precocemente. No Brasil, a situação é preocupante, com um aumento significativo na proporção de casos diagnosticados tardiamente, caracterizados por deformidades, o que eleva o país para a categoria de alta endemicidade (WHO, 2024). Em 2023, foram registrados 9.729 casos de hanseníase com grau 2 de incapacidade física no diagnóstico. Índia, Brasil (2.374 casos) e Indonésia concentraram a maioria. Globalmente, houve aumento de 1,8%, e no Brasil, de 16,0% em relação a 2022 (Brasil, 2024).

Figura 1 - Proporção de casos novos de hanseníase avaliados quanto ao grau de incapacidade física no momento do diagnóstico – Brasil, 2013 a 2022.

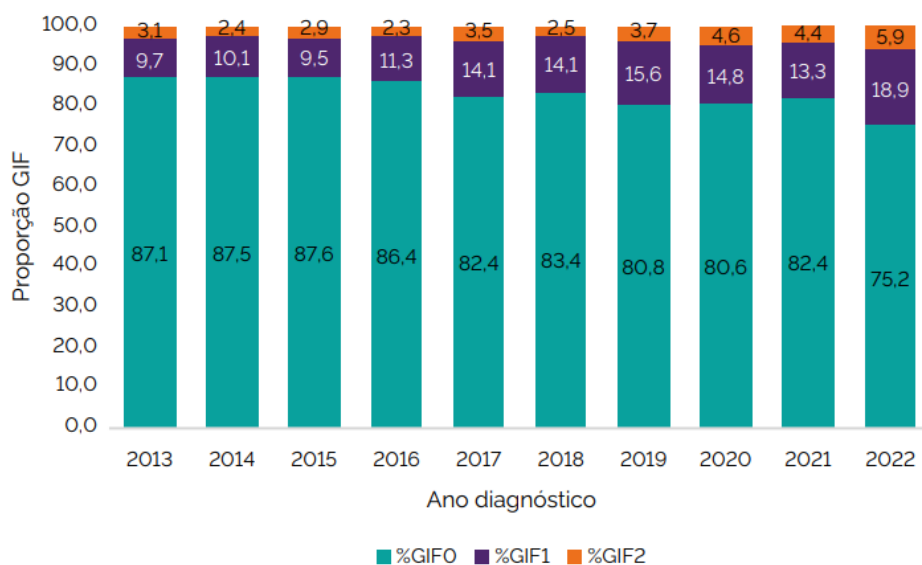


Fonte: Sinan/SVSA/MS.

Fonte: Boletim Epidemiológico | Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente | Ministério da Saúde (Brasil, 2024).

Outro indicador relevante é número de novos casos de hanseníase em crianças e adolescentes abaixo de 15 anos, o que reflete uma transmissão recente. Em 2022, houve um aumento de 14,6% no número de novos casos de hanseníase em crianças e adolescentes abaixo de 15 anos em relação a 2021, totalizando 10.302 casos (WHO, 2023). A taxa de incidência mundial nesse grupo etário foi de 5,1 casos por 1 milhão de habitantes. No Brasil, observou-se uma redução na taxa de detecção de casos novos em menores de 15 anos entre 2013 e 2022. Porém, houve aumento na proporção de GIF 2 nessa faixa etária, o que indica em diagnóstico tardio nesta faixa etária. A ocorrência da hanseníase em crianças é importante indicador epidemiológico de determinação do grau de transmissão, da magnitude da doença no território e sinaliza a necessidade de reforço nas ações de vigilância, sobretudo no âmbito domiciliar (Brasil, 2024).

Figura 2 - Proporção de casos novos de hanseníase em menores de 15 anos avaliados quanto ao grau de incapacidade física no momento do diagnóstico – Brasil, 2013 a 2022



Fonte: Sinan/SVSA/MS.

Fonte: Boletim Epidemiológico | Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente | Ministério da Saúde (Brasil, 2024).

A vigilância em relação aos contatos dos pacientes é também fundamental para o controle da disseminação da doença. Foi observado um aumento do número de contatos examinados, de 75,1% em 2013 para 76,9% em 2022, porém é um parâmetro considerado irregular. As Regiões Norte e Nordeste do país apresentaram aumento

de 0,9% e 10,9%, respectivamente. As demais regiões reduziram a proporção de contatos examinados, com maior diminuição sendo verificada na região Sudeste (Brasil, 2024).

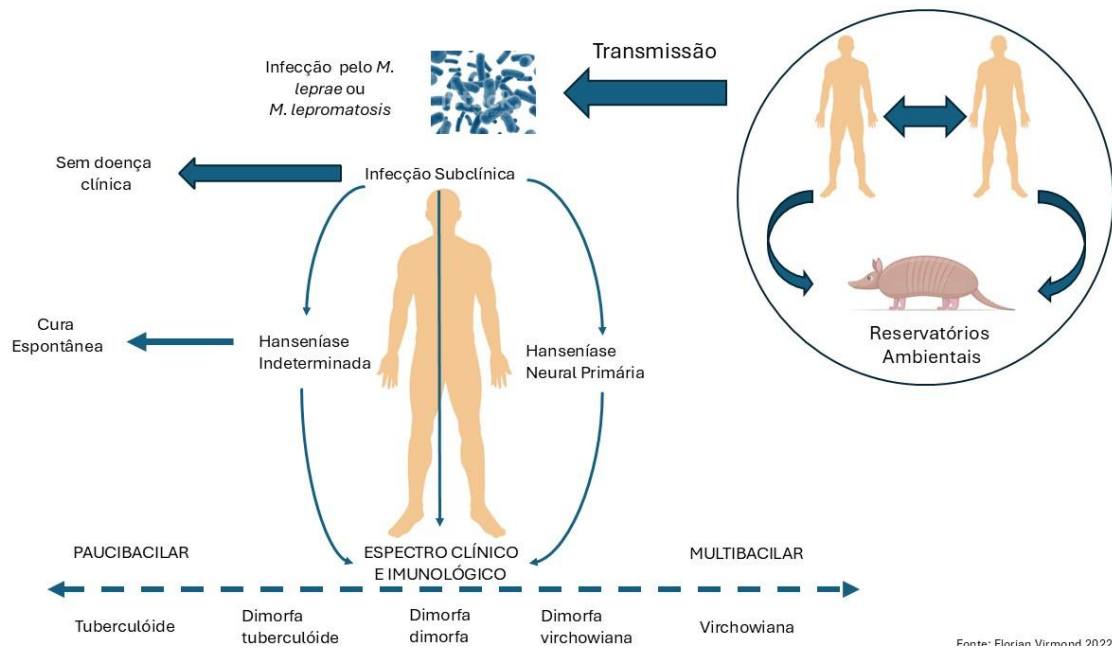
2.3 FORMAS DE TRANSMISSÃO DA HANSENÍASE

Os pacientes infectados com alta carga bacilar e sem tratamento são a principal fonte de infecção da hanseníase, pois eliminam o bacilo pelas vias áreas superiores que contamina contatos próximos. Este modo de transmissão é apoiado pelo risco aumentado observado entre contatos domiciliares de pacientes com hanseníase (Ploemache, 2020).

A transmissão zoonótica, particularmente envolvendo o tatu-de-nove-bandas (*Dasypus novemcinctus*) é outra via. Os tatus são reservatórios naturais do *M. leprae* e têm sido implicados na transmissão da hanseníase para humanos. Estudos têm mostrado que o contato direto com tatus, bem como a caça, o manuseio e o consumo da carne do tatu, estão associados a um risco aumentado de hanseníase. Por exemplo, uma revisão sistemática e meta-análise descobriram que indivíduos que tiveram contato direto com tatus ou consumiram sua carne tiveram um risco significativamente maior de contrair hanseníase, com uma razão de chances (OR) de 2,60. Outro estudo realizado na Amazônia brasileira confirmou altas taxas de infecção por *M. leprae* em tatus selvagens e descobriu que indivíduos que consumiam frequentemente carne de tatu tinham títulos anti-PGL-1 mais altos, um biomarcador para infecção por *M. leprae* (Silva *et al.*, 2018; Stefani *et al.*, 2019).

O período de incubação da doença é variável e imprevisível, com estimativas médias de cinco anos. No entanto, há registros de manifestação dos sintomas tanto em prazos inferiores a um ano após a exposição ao agente infeccioso quanto em períodos superiores a duas décadas (Scollard, 2016).

Figura 3 - História natural da hanseníase.



Fonte: Adaptado de: DEPS, P. D.; FLORIAN, M. C.; VIRMOND, M. C. L. Hanseníase na prática clínica. São Paulo: Editora dos Editores Eireli, 2022.

2.4 IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE

A hanseníase é uma doença provocada pela bactéria *M. leprae*, que atinge inicialmente o sistema nervoso periférico. Os pacientes podem apresentar diferentes sintomas clínicos, imunológicos e patológicos, mesmo com pouca variação genética entre os bacilos isolados. As manifestações clínicas da doença estão ligadas à sobrevivência do *M. leprae*, às respostas imunológicas inata e adquirida, além das interações entre proteínas do hospedeiro e da bactéria, o que pode tanto impedir sua invasão e infecção quanto favorecer seu desenvolvimento e patogênese (Ridley; Jopling, 1966).

Nesse contexto, a doença se manifesta desde a hanseníase tuberculóide com forte resposta imune mediada por células até a hanseníase virchowiana caracterizada por resposta humoral mais evidente (Britton; Lockwood 2004; Talhari, 2015). A resposta imune inata tem papel essencial nos primeiros estágios da infecção. Os macrófagos e as células de Schwann são os principais alvos do *M. Leprae* (Sadhu, 2018; Yasmin, 2021). Quando o bacilo interage com essas células, ocorrem mudanças metabólicas como a formação de estruturas lipídicas que estão ligadas ao fenótipo

dos macrófagos M2 e à produção de mediadores anti-inflamatórios. Essas modificações promovem a diferenciação das células T em um fenótipo regulador, que inibe as funções de defesa contra o bacilo, permitindo o aumento da carga bacilar e a progressão à doença ativa (Cabral *et al.*, 2022; De Macedo *et al.*, 2020).

A resposta imune adaptativa é essencial na determinação da forma clínica da hanseníase. Na forma tubercoide (TT), predomina uma resposta Th1 caracterizada pela produção de IFN- γ e IL-2, que ativam macrófagos para matar patógenos intracelulares. Por outro lado, a forma virchowiana (VV) está associada a uma resposta Th2, marcada pela produção de IL-4, IL-5 e IL-10, que regula negativamente a imunidade mediada por Th1 e facilita a proliferação bacilar. As células T reguladoras (Tregs) e as células T CD8+ também desempenham papéis na modulação da resposta imune, contribuindo para a resposta imune observada na forma VV (Silva *et al.*, 2024).

Estudos destacam o papel de vários subconjuntos de células T além do paradigma tradicional Th1/Th2. Células Tregs e Th17 têm sido implicadas na imunopatogênese da hanseníase. Células Tregs produzem IL-10 e TGF- β que estão associadas à supressão imunológica e à sobrevivência do *M. leprae*, particularmente na forma VV da doença. Células Th17 produzem IL-17 e estão associadas à resposta imune protetora, sendo mais prevalentes na hanseníase TT (Souza, 2017; Tarique *et al.*, 2018).

Ademais, a modulação de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) também está envolvida na imunopatogênese da doença. A menor exposição de moléculas de MHC em resposta ao PGL-1 do *M. leprae* dificulta a ativação dos linfócitos T das células dendríticas, contribuindo para a gravidade da infecção. Além disso, a diferenciação de fenótipos de macrófagos dependentes da ativação do receptor de reconhecimento de padrões (PRR) pode definir o tipo de células T auxiliares (Th) envolvidas de acordo com a gravidade da doença (Silva *et al.*, 2024).

Por fim, os receptores *Toll-Like* (TLRs) apresentam um papel importante na resposta imune ao *M. leprae*. Eles são receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRR) encontrados em monócitos e células dendríticas e o subtipo 2 (TLR2) reconhece o bacilo causador da hanseníase, levando à secreção de IL-12, interleucina que leva a produção de outras citocinas pró-inflamatórias e a eliminação do bacilo (Ridley; Jopling, 1966). Uma variação genética, mais fortemente associada à forma VV foi descrita no gene que codifica para TLR2. Estudo genético funcional mostrou

que mutação de perda de função nesse receptor leva a menor produção de IL-12 por macrófagos em resposta a *M. leprae*, sugerindo que eventuais polimorfismos genéticos nesse receptor também possam afetar a história natural da hanseníase (Bochud *et al.*, 2008).

2.5 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

Devido à característica espectral da doença, a hanseníase possui quatro classificações. As classificações utilizadas pela OMS e de Nepal são operacionais e as outras duas classificações são mais informativas e pormenorizadas conforme mostra a tabela 1 (Deps; Florian; Virmond, 2022). A classificação de Ridley e Jopling tem sido mais utilizada na pesquisa científica, por dermatologistas e hansenólogos. Esta classificação reconhece cinco formas clínicas e baseia-se em critérios clínicos, histopatológicos, imunológicos (teste de Mitsuda) e bacteriológicos (baciloscopia).

No início do espectro, encontra-se a forma tuberculóide (TT) que apresenta resposta imunológica predominantemente celular e maior resistência à infecção. O grupo dimorfo encontra-se no centro do espectro, apresenta resistência intermediária e é subdividido em dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV), de acordo com a proximidade a um dos polos. Os casos VV encontram-se no final do espectro, apresentam resposta imunológica predominantemente humoral e pouca resistência à infecção (Ridley; Jopling, 1966).

A forma indeterminada (I) é a forma inicial da doença e não pode ser classificada dentro do espectro, uma vez que a resposta imune do hospedeiro ainda não está definida (Ridley; Jopling, 1966). Nessa fase, o quadro é exclusivamente cutâneo e não há comprometimento neural. Se não tratada, a forma I pode evoluir para qualquer uma das formas espectrais e, nesses casos, poderá desenvolver neuropatia periférica, se o tratamento não for instituído prontamente (Talhari *et al.*, 2015; Cruz *et al.*, 2017).

Outra forma clínica descrita e motivo de controvérsia nas classificações é a hanseníase neural primária (NP), caracterizada por neuropatia periférica, sem evidência atual ou progressiva de lesões cutâneas e baciloscopia negativa. Seu diagnóstico clínico baseia-se na presença de deficiência sensitiva e ou motora e espessamento neural (Suneetha *et al.*, 2005; Mendiratta; Khan; Jain, 2006). Porém, estudos têm proposto diagnóstico precoce desta manifestação através de exames de

imagem como ultrassonografia (Luppi, 2023).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) tem adotado a classificação operacional para fins de escolha de tratamento. Casos com até cinco lesões de pele e baciloscopia obrigatoriamente negativa são classificados como PB e são tratados com PQT-U por seis meses. Casos com mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva são classificados como MB e devem receber PQT-U por 12 meses (Brasil, 2022). Casos que apresentam mais de um nervo periférico comprometido são classificados de forma consensual como MB. Para casos com comprometimento de apenas um nervo, a OMS recomenda a classificação como MB, enquanto o MS do Brasil considera que esses casos devam ser classificados e tratados como PB (WHO, 2018; Brasil, 2022).

Tabela 1 - Classificações da hanseníase e correlações.

Baciloscopia no raspado dérmico	Madri 1952	Ridley- Jopling 1966	OMS 1981	Nepal 1985
Negativa	I	*	Paucibacilar	Paucibacilar
Negativa	T D	TT DT	Paucibacilar	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Paucibacilar ▪ Até 02 áreas corporais
Positiva	D V	DT DD DV VV	Multibacilar	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Multibacilar ▪ De a 3 a 7 (ou 9) áreas corporais

Fonte: Adaptado de: DEPS, P. D.; FLORIAN, M. C.; VIRMOND, M. C. L. Hanseníase na prática clínica. São Paulo: Editora dos Editores Eireli, 2022.

2.6 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico (Lastoria; Abreu, 2014). Até o momento, nenhum teste laboratorial é considerado suficiente para diagnosticar a doença em todas as suas formas clínicas (WHO, 2018; Brasil, 2022).

2.6.1 Diagnóstico clínico

O MS do Brasil define um caso de hanseníase pela presença de um ou mais dos seguintes sinais cardinais da doença: lesão e/ou área de pele com alteração de sensibilidade; espessamento de nervo periférico associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; presença de *M. leprae* na baciloscopia do esfregaço

intradérmico ou na biópsia de pele (WHO, 2018; Brasil, 2022).

2.6.2 Diagnóstico histológico

A análise histopatológica de biópsias de nervos e pele pode fornecer informações valiosas que complementam os achados clínicos e outros testes diagnósticos. Embora não seja considerado obrigatório pela OMS, ele auxilia na classificação espectral de Ridley e Jopling e na confirmação de casos de recidiva (Ridley; Jopling, 1966; Brasil, 2022). Assim, a resposta imune frente ao *M. leprae* define as alterações histopatológicas na hanseníase que, por sua vez, determinam as características clínicas da doença (Deps; Florian; Virmond, 2022).

Há achados bem descritos em cada forma clínica, contudo, a ausência dos achados não exclui a doença. Na forma TT, observam-se granulomas bem formados com focos de células epitelióides, que podem estar acompanhadas de células gigantes multinucleadas do tipo Langhans, circundados por halo linfocitário. Nesse caso, não se encontram bacilos. Os granulomas da forma DT são praticamente indistinguíveis dos da TT em sua composição (Ridley; Jopling, 1966).

As células epitelióides estão presentes na resposta tecidual das lesões de TT, DT e DD. Células de Langerhans podem ser encontradas nas lesões de TT e DT. Enquanto nas lesões DD e DV há células gigantes vacuolizadas e macrófagos espumosos estão presentes nas lesões DV e VV. A zona grenz corresponde a uma área subepidérmica livre de infiltrado inflamatório, observada nas lesões das formas VV, DV e DD. Já a laminação do perineuro em “casca de cebola” é um achado típico de lesões das formas VV e DV (Rongioletti, 2009).

Quanto à hanseníase históide, originalmente cunhado por Wade, em 1963, apresenta o conceito histopatológico de hansenoma rico em bacilos e composto de macrófagos fusiformes juntamente com a ausência de formação de globias (Wade, 1963; Froes, 2022). Em relação à forma indeterminada, observa-se apenas a presença de infiltrado linfo-histiocitário de localização perineural e perianexial, sem presença de bacilos. A hanseníase indeterminada pode evoluir com cura espontânea ou para qualquer uma das cinco apresentações clássicas, dependendo do padrão de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro (Canuto, 2018). Ademais, o exame histológico do nervo é útil e indicado no diagnóstico da hanseníase neural primária (Brasil, 2022). As alterações histológicas, juntamente com dados clínicos,

eletroneuromiográficos e laboratoriais pertinentes são úteis mesmo na ausência de bacilos álcool-ácido resistentes na amostra do nervo (Antunes, 2012).

Assim, o exame histológico é um exame útil, principalmente, auxiliando a clínica. Em um estudo que comparou a opinião de três diferentes patologistas acerca de 200 biópsias de casos suspeitos, a porcentagem de biópsias com evidências definitivas de hanseníase variou de 39% a 58% (Fine *et al.*, 1986). De acordo com a revisão sistemática e meta-análise realizada por Torres *et al.*, a sensibilidade do exame histopatológico para hanseníase MB é de aproximadamente 78%, com especificidade de 92% (Torres *et al.*, 2021). Porém, para a hanseníase PB, a sensibilidade do exame histopatológico é significativamente menor, em torno de 31% (Santos *et al.*, 2013).

2.6.3 Baciloscopia

A baciloscopia é uma ferramenta tradicional de diagnóstico da hanseníase, usada principalmente para detectar bacilos álcool-ácido resistentes em lesões cutâneas. O resultado é expresso na forma de índice baciloscópico (IB), que é baseado em uma escala logarítmica com variação entre 0 - ausência de bacilos em 100 campos - e 6 - mais de 1.000 bacilos por campo - (Brasil, 2010). A importância do exame reside na capacidade de fornecer visualização direta do *M. leprae*, crucial para a confirmação do diagnóstico de hanseníase multibacilar. Contudo, a sensibilidade da baciloscopia é limitada, principalmente nos casos paucibacilares onde a carga bacteriana é baixa. Segundo a literatura, a sensibilidade do exame baciloscópico é de aproximadamente 24.5%, com especificidade de 100% (Lima *et al.*, 2022). Essa alta especificidade o torna um teste confiável para confirmar a hanseníase quando bacilos são detectados, mas sua baixa sensibilidade limita sua utilidade no diagnóstico de casos com baixas cargas bacilares.

2.6.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR mostrou maior sensibilidade em comparação ao exame baciloscópico, particularmente nos casos PB, onde pode detectar DNA de *M. leprae* mesmo quando os bacilos não são visíveis ao microscópio (Banerjee *et al.*, 2011). O exame demonstra sensibilidade de até 100% nos casos de hanseníase VW e 93,1% no geral, quando

comparada à histopatologia (Sarath; Joseph; Jamir, 2023). A especificidade permanece em 100%, tornando a PCR uma ferramenta de diagnóstico confiável. A porcentagem de detecção do DNA de *M. leprae* foi de 44% dos pacientes PB que foram negativos pela baciloscopia, destacando sua superioridade em casos em estágio inicial e com baixa carga bacilar (Siwakoti, 2016). Outro estudo descobriu que o qPCR sozinho teve uma sensibilidade de 57% na identificação de hanseníase em casos suspeitos de PB com histologia inconclusiva (Barbieri *et al.*, 2019).

A PCR pode identificar *M. leprae* em amostras de biópsia de pele e swabs nasais, facilitando o diagnóstico precoce em casos clinicamente suspeitos (Pathak *et al.*, 2024). Portanto, é eficaz na detecção de casos com baixas cargas bacilares, que muitas vezes passam despercebidas pelos métodos tradicionais (Khatoon *et al.*, 2021; Pathak, *et al.*, 2024). Os avanços na tecnologia PCR, como PCR multiplex e PCR em tempo real, melhoraram ainda mais as capacidades de diagnóstico. A PCR multiplex, que tem como alvo múltiplos elementos genéticos do *M. leprae*, mostrou taxas de positividade mais altas em comparação aos métodos de PCR de alvo único, tornando-se uma ferramenta diagnóstica robusta (Manta *et al.*, 2022; Pathak, *et al.*, 2024). Entretanto, um limitador desta técnica é o alto custo, que necessita de um aparato oneroso e indisponível em grande parte das áreas endêmicas.

2.6.5 Testes sorológicos

Os testes sorológicos para identificar infecções e acompanhar a resposta ao tratamento são bastante relevantes. Embora haja alguns testes disponíveis, nenhum deles possui a especificidade e sensibilidade ideais para o diagnóstico de todas as formas clínicas da hanseníase (Rodrigues; Lockwood, 2011; OMS, 2018). A OMS observa que os exames sorológicos já existentes, como ELISA e o teste de contrafluxo lateral, têm baixa sensibilidade para os casos de hanseníase PB, que são mais desafiadores de diagnosticar clinicamente em comparação aos casos MB (Brasil, 2022).

O PGL-1 é o principal glicolípido antigênico do *M. leprae* e foi descrito desde 1980 (Brennan; Barrow, 1980; Hunter; Brennan, 1981), sendo capaz de desencadear resposta humoral específica, com produção predominante de IgM (Young *et al.*, 1984). O PGL-1 é utilizado em estudos sorológicos desde 1982 (Paulyne; Drapper; Rees, 1982). E também tido outras aplicações como meio de ensaio imunoenzimático

(ELISA), testes de hemaglutinação, *dipstick* e teste rápido de fluxo lateral (ML Flow) (Moura et al., 2008). O teste rápido ML *dipstick*, qualitativo, demonstrou 97,2% de concordância com o ELISA na detecção de IgM anti-PGL-1 (Buhner-Sékula et al., 1998). Já o ML Flow fornece resultados em 10 minutos, com 91% de concordância com o ELISA (Buhner-Sékula et al., 2003).

Em 2006, Reece et al. conduziram um estudo em escala reduzida que indicou o reconhecimento das proteínas ML0405 e ML2331 por soros de pacientes multibacilares (MB) com alto índice baciloscópico. Posteriormente, Duthie et al. (2007), em uma investigação com amostra ampliada, reforçaram o potencial diagnóstico dessas proteínas, demonstrando sua eficácia na detecção de casos MB, independentemente da procedência geográfica, e de parte dos casos paucibacilares (PB). Com base nesses achados, foi desenvolvida uma proteína de fusão composta por ML0405 e ML2331, denominada LID-1, *Leprosy Infectious Disease Research Institute (IDRI) diagnostic-1* (Duthie et al., 2007).

Em relação aos testes sorológicos, como os que detectam anticorpos contra o PGL-1 e o antígeno de fusão LID-1, apresentam maior sensibilidade e especificidade em comparação à baciloscopia. Por exemplo, a sorologia anti-PGL-1 demonstrou sensibilidade de 67% e especificidade de 93% para a hanseníase MB, enquanto a sorologia anti-LID-1 demonstrou sensibilidade de 87,5% e especificidade de 100% para os casos MB. Esses testes são particularmente úteis na detecção da hanseníase MB, onde a carga bacilar é maior (Lopes-Luz et al., 2023).

Outro antígeno extensivamente investigado para o diagnóstico sorológico da hanseníase é o NDO-LID, que consiste na fusão dos antígenos previamente caracterizados LID-1 e ND-O. Esse complexo mantém a capacidade dos antígenos isolados de reconhecer anticorpos, sendo capaz de se ligar tanto a IgM quanto a IgG, o que contribui para o aumento da sensibilidade dos testes ELISA (Duthie et al., 2014). Estudos demonstraram que testes como o NDO-LID podem detectar uma proporção significativa de casos MB com alta sensibilidade e especificidade. Por exemplo, o teste NDO-LID demonstrou sensibilidade de 87% e especificidade de 97,4% para a hanseníase MB. Isto torna os testes sorológicos uma ferramenta valiosa para confirmar a hanseníase MB, onde métodos tradicionais como a baciloscopia podem ser menos sensíveis (Duthie et al., 2014).

Testes sorológicos rápidos no local de atendimento (POC- *Point of care*), como os baseados em antígenos PGL-1 e NDO-LID, oferecem vantagens práticas em

ambientes com recursos limitados. Esses testes são fáceis de realizar, econômicos e não requerem infraestrutura laboratorial sofisticada. Uma meta-análise relatou que os testes PGL-1 e NDO-LID têm alta sensibilidade e especificidade para a hanseníase MB (Romero *et al.*, 2022). Porém, apesar de todos os esforços dos pesquisadores para identificar antígenos do *M. leprae*, sejam eles da própria bactéria ou mesmo recombinantes, ainda não há antígeno com sensibilidade e especificidade satisfatórias para ser usado como teste diagnóstico para ambas as formas clínicas da hanseníase. Deve considerar-se que a diferença na modulação do respostas imunes das formas PB e MB corroboram essa dificuldade na identificação de antígenos, uma vez que a produção de anticorpos por essas formas clínicas são inerentes e característica (Oliveira *et al.*, 2020).

Além da LID-1 e do NDO-LID, outros antígenos de fusão também foram desenvolvidos e analisados em testes sorológicos para hanseníase. Em um estudo realizado com pacientes do Nepal e das Filipinas, 144 proteínas do *Mycobacterium leprae* foram investigadas quanto ao seu potencial diagnóstico. Dentre elas, as que melhor distinguiram soros de pacientes multibacilares (MB) daqueles de indivíduos saudáveis residentes em áreas endêmicas foram: ML0405, ML2331, o antígeno de fusão ML0050-0049, ML2055, ML0091 e ML0411 (Duthie *et al.*, 2014). Posteriormente, epítomos imunorreativos das proteínas ML0405, ML2331, ML2055, ML0411 e ML0091 foram incorporados na construção de uma proteína quimérica multiepitópica, denominada PADL (Protein Advances Diagnostic of Leprosy) (Duthie *et al.*, 2010). Para verificar a precisão diagnóstica da PADL na hanseníase, amostras de soro de pacientes paucibacilares (PB), multibacilares (MB) e de indivíduos controle de área endêmica, oriundos das Filipinas, foram submetidas a testes ELISA. A proteína apresentou reatividade em 16 das 20 amostras de casos MB, enquanto apenas 1 das 15 amostras de casos PB foi positiva (Duthie *et al.*, 2010).

Desenvolvido em 2003 e amplamente utilizado em pesquisas, o ML Flow é um teste imunocromatográfico projetado para detectar anticorpos IgM contra o antígeno PGL-1 do *Mycobacterium leprae* (Brasil, 2022). Ele pode ser aplicado em amostras de soro humano ou sangue total. O princípio do teste envolve a interação dos anticorpos presentes na amostra com o antígeno PGL-1, que está fixado em uma membrana porosa de nitrocelulose. Durante o procedimento, a amostra biológica atravessa essa membrana, permitindo a detecção dos anticorpos por meio dessa ligação específica (Lyon *et al.*, 2008). A detecção de anticorpos anti-PGL-1 não pode ser utilizada como

único critério diagnóstico para hanseníase. Isso ocorre porque pessoas saudáveis podem apresentar resultados sorológicos positivos, enquanto pacientes com hanseníase, especialmente aqueles com formas paucibacilares, podem apresentar resultados negativos na sorologia (Brasil, 2022). O uso do teste rápido da hanseníase, no âmbito do SUS, está aprovado para uso exclusivo na investigação de contatos de casos confirmados de hanseníase (Brasil, 2022).

Outras aplicabilidades dos testes sorológicos é que podem servir para o monitoramento da eficácia do tratamento e a progressão da doença. Por exemplo, a natureza quantificável de testes como o NDO-LID permite monitorizar os níveis de anticorpos ao longo do tempo, o que pode indicar o sucesso do tratamento ou a necessidade de intervenção adicional (Duthie *et al.*, 2014).

Ademais, esses testes podem ajudar a identificar indivíduos com maior risco de adoecimento. Os contatos de pacientes MB estão em maior risco de desenvolver a doença (Sales *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2020 ; Teixeira *et al.*, 2020; Hacker *et al.*, 2021, Alecrin *et al.*, 2024). Estudos mostram que as taxas de soropositividade são maiores em contatos de pacientes com hanseníase, sugerindo que esses testes podem ser utilizados para triagem e intervenção precoce em áreas endêmicas (Amorim *et al.*, 2016). A soropositividade entre pessoas assintomáticas que tiveram contato com pacientes hansênicos sugere que o bacilo se disseminou a partir do local de infecção, indicando a presença de infecção subclínica (Araujo *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2016; Frade *et al.*, 2017). Contatos positivos nos ensaios de ELISA apresentam risco de desenvolvimento de hanseníase 7,2 vezes maior que os soronegativos. Quando avaliamos o risco de desenvolvimento apenas de formas MB, o risco relativo é ainda mais alto, chegando a 24 vezes (Douglas *et al.*, 2004). De forma semelhante, estudo conduzido em Minas Gerais, que acompanhou 1396 contatos domiciliares de casos PB ou MB de hanseníase por cinco anos, mostrou que os contatos com teste ML-Flow positivo apresentaram risco relativo quase seis vezes maior para a ocorrência da doença (Goulart *et al.*, 2008). Em estudo longitudinal que acompanhou 2992 contatos por 5 a 10 anos, a positividade do ELISA anti-PGL-1 foi associada ao aumento do risco de adoecimento em seis vezes (RR= 5,68) (Araujo *et al.*, 2015).

Um estudo de coorte mais recente construiu modelos de predição de risco de adoecimento entre os contatos de hanseníase. Neste estudo, 600 contatos de pessoas com hanseníase tratadas no Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia da Saúde da Universidade Federal de Uberlândia foram

acompanhados entre 2002 e 2022. O estudo desenvolveu quatro modelos preditivos para avaliar o risco de hanseníase em contatos. Entre eles, o Modelo 3 foi identificado como o melhor para prever o risco de doença. Esse modelo incluiu as variáveis: anti-PGL-1 IgM positivo, ausência de cicatriz BCG-ID e idade ≥ 60 anos como fatores de risco (Alecrin *et al.*, 2024). Assim, é extremamente importante considerar os testes sorológicos como uma ferramenta de monitoramento e vigilância dos contatos.

2.6.6 Proteômica

A proteômica é o estudo das proteínas produzidas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado momento e sob condições específicas (Parkash; Singh, 2012). A literatura científica destaca várias áreas em que a proteômica é relevante como, por exemplo, a identificação de antígenos, perfis antigênicos específicos da doença e biomarcadores prognósticos (Groathouse *et al.* 2006; Wiker, 2011). Na hanseníase, permitiu uma melhor compreensão da biologia do *M. leprae*, que não pode ser cultivado em laboratório (Parkash; Singh, 2012).

A aplicação de proteômicas no estudo do *M. leprae* foi iniciada em 1996 por Pessolani e colaboradores (Pessolani; Brennan, 1996). Desde então, outros estudos têm buscado descrever novas proteínas do *M. leprae*, utilizando para isso diferentes plataformas, incluindo eletroforese unidimensional, eletroforese bidimensional, electroblotting e cromatografia líquida para separação das proteínas e sequenciamento de Edman ou espectrometria de massa para identificação das proteínas (Parkash; Singh, 2012). Devido à pequena quantidade de bactéria disponível a partir do tatu infectado, a definição completa do proteoma do *M. leprae* constitui um desafio. Para aumentar a possibilidade de detecção de proteínas expressas em menor quantidade, o bacilo pode ser fracionado em seus três componentes subcelulares principais: parede celular, membrana citoplasmática e fração citosólica solúvel (Marques *et al.*, 2004).

Um estudo realizou uma análise proteômica avançada, combinando diversas técnicas de separação e espectrometria de massas para identificar 218 novas proteínas de *M. leprae*. Com isso, o total de proteínas conhecidas desse patógeno aumentou de 66 para 284, representando 17,6% dos genes previstos pela sequência genômica. Entre as proteínas recém-identificadas, 60 estavam na fração citosólica, 98

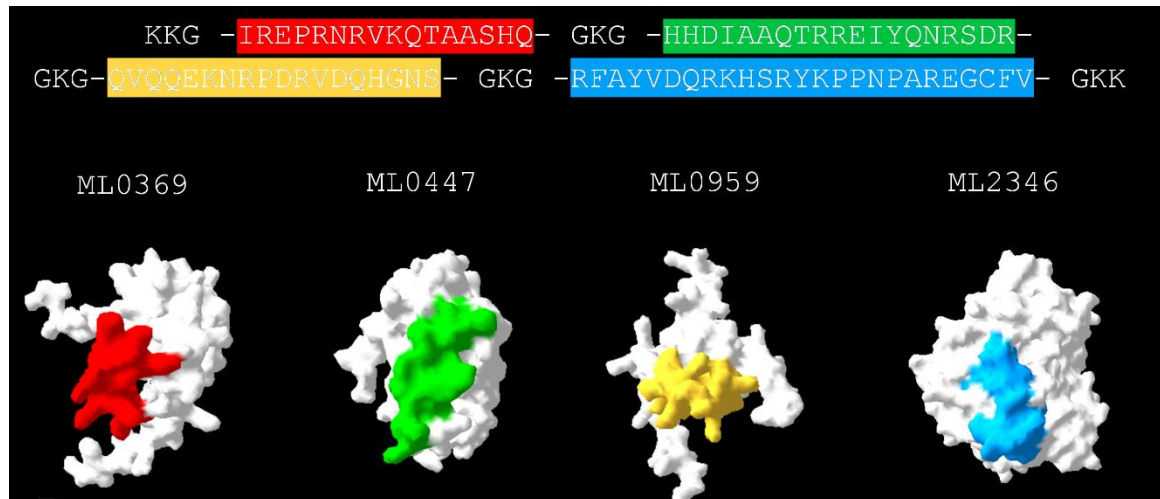
na membrana e 104 na parede celular. Entre as proteínas identificadas, cinco parecem ser específicas de *M. leprae*, enquanto as demais possuem homólogos em *M. tuberculosis*. Dessas, quatro estão localizadas no envelope celular (na parede celular ou na parede e membrana ao mesmo tempo): ML0369 (proteína hipotética conservada), ML0447 (proteína hipotética conservada), ML0959 (proteína hipotética) e ML1553 (prolyl tRNA sintetase) (Marques *et al.*, 2008).

No estudo de Wiker *et al.* (2011), os pesquisadores investigaram a presença de proteínas específicas de *M. leprae* entre aquelas identificadas por espectrometria de massa. Dos 155 genes potencialmente exclusivos desse bacilo, apontados por Marri *et al.* (2006), foram detectadas apenas 13 proteínas. Isso sugere que somente uma pequena fração das proteínas exclusivas do *M. leprae* é expressa em níveis suficientemente altos para serem consideradas candidatas promissoras no sorodiagnóstico da hanseníase. As sequências de aminoácidos de 13 proteínas identificadas foram analisadas via Blast-p para localizar os homólogos mais próximos. Três dessas proteínas apresentaram homólogos em *M. tuberculosis* (ML0050, ML0410 e ML0593) e duas em *Mycobacterium ulcerans* (ML0126 e ML1106). Entre as oito proteínas restantes, que parecem ser específicas, duas se destacaram pela falta de homologia com outras micobactérias e por serem altamente expressas: ML2346 (proteína hipotética) e ML2347 (proteína hipotética conservada) (Wiker; Tomazella; Souza, 2011).

Em um estudo recente, foram selecionadas nove proteínas específicas do *M. leprae*, descritas por proteômica, para compor a quimera M1: ML0308, ML0333, ML0369, ML0447, ML0458, ML0959, ML1553, ML2346 e ML2347. Após a análise da sequência de aminoácidos por meio do Blast-p, foram escolhidas as proteínas com menor similaridade com outras espécies do gênero *Mycobacterium*. Assim, as proteínas ML0369, ML0447, ML0959 e ML2346 foram selecionadas para compor a proteína M1 (Assis *et al.*, 2024). A disposição de cada um dos epítomos dentro da proteína quimérica foi escolhida de forma a mimetizar a disposição desses na sua própria proteína de origem. Para evitar sobreposição espacial e como forma de criar um espaçamento entre os epítomos, na proteína M1 as sequências foram agrupadas linearmente com espaçamento de duas glicinas (GLY) e uma lisina (LYS) entre cada uma, de forma a formar uma única proteína com diferentes epítomos. Foram ainda adicionados dois aminoácidos LYS e um aminoácido GLY na parte inicial e terminal da proteína, a fim de torná-la solúvel (Figura 2). O desempenho das proteínas

quiméricas para o sorodiagnóstico da hanseníase foi avaliado por ensaios de ELISA utilizando-se soros de casos da doença e de controles (Assis *et al.*, 2024).

Figura 4 - Sequência de aminoácidos das quatro regiões epitópicas selecionadas para compor a proteína quimérica M1, provenientes das proteínas ML0369, ML0447, ML0959 e ML2346



Fonte: Adaptado de Assis *et al.* (2024).

A proteína M1 apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98,44% para diagnóstico dos casos MB e PB em comparação com o controle de pacientes sem doenças conhecidas. Na avaliação do desempenho da proteína M1 em diferenciar casos de hanseníase de outras doenças infecciosas, a sensibilidade foi de 92% e a especificidade foi de 99% em casos MB. Já nos pacientes PB, a sensibilidade e a especificidade foram, respectivamente, 75 e 99%. Houve diferença significativa entre as médias de densidade óptica (DO) na comparação entre os grupos MB e PB, MB e controles saudáveis, MB e doenças infecciosas, PB e controles saudáveis e PB e doenças infecciosas ($p < 0,05$). Assim, a proteína M1 demonstrou no soro alta sensibilidade e especificidade ao distinguir pacientes com hanseníase de indivíduos saudáveis e com outras doenças, indicando seu potencial como ferramenta diagnóstica (Assis *et al.*, 2024).

2.7 AMOSTRAS BIOLÓGICAS NÃO INVASIVAS

O diagnóstico da hanseníase fundamenta-se em métodos invasivos para a coleta de amostras biológicas, visando a detecção de microorganismos, antígenos e anticorpos e alterações histológicas resultantes da imunidade do indivíduo. Dentre

esses métodos, destacam-se a utilização de técnicas como punções periféricas e biópsias de pele. Além disso, para realizar a baciloscopia é necessário pressionar a pele o suficiente para obter isquemia, manter a pressão até o final da coleta e fazer um corte na pele de aproximadamente 5 mm nos locais indicados (Brasil, 2010).

Apesar de o soro ser a amostra mais convencional para testes imunológicos, sua coleta pode representar um desafio em comunidades remotas ou com acesso restrito à saúde. Isso se deve não apenas à dificuldade de alcance dessas áreas, mas também à escassez de recursos financeiros e infraestrutura. Muitos desses locais apresentam limitações na aquisição de equipamentos, na presença de profissionais qualificados para o processamento adequado das amostras (Eamudomkarn *et al.*, 2018; CDC, 2022).

Além disso, a fobia de agulhas afeta cerca de 10% da população mundial, sendo ainda mais prevalente em crianças, levantando a recusa de procedimentos diante do medo (Sokolowski *et al.* 2010; McLenon; Rogers, 2018). Perante a necessidade do desenvolvimento de métodos diagnósticos não invasivos, a utilização de secreções e fluidos corporais emerge como uma perspectiva promissora, viabilizando aplicações clínicas eficazes para diversas doenças e potencialmente integráveis a dispositivos rápidos no local de atendimento (Ates *et al.*, 2021). Outros analitos, como saliva, *swab* oral, secreção nasal, urina, entre outros, também poderiam ser considerados para avaliação de anticorpos específicos para diagnóstico de doenças (Zhang *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2018; Andama *et al.*, 2022).

Nesse contexto, há inúmeras vantagens na utilização de amostras de urina para aplicação em testes diagnósticos e estudos epidemiológicos. Primeiro, em condições normais de saúde, a urina pode ser colhida de modo não invasivo, fácil e em grande volume, não traumática e menos desconfortável. As amostras de urina podem ser colhidas pelos próprios pacientes instruídos, cuidadores, agentes comunitários de saúde e qualquer profissional de saúde utilizando um coletor universal estéril oferecido pelo estabelecimento de saúde ou pela coordenação da pesquisa. Por fim, é de fácil armazenamento, sem necessidade de equipamentos laboratoriais para o processamento, além de o manuseio apresentar baixo risco de infecções acidentais (Decramer *et al.*, 2008; Eamudomkarn *et al.*, 2018; Asfaram *et al.*, 2018, Nagaoka *et al.*, 2021).

2.7.1 Urina na detecção de anticorpos

As primeiras evidências objetivas da presença de imunoglobulinas na urina foram registradas por Boyce e colaboradores em 1954 e por McGarry e sua equipe em 1955. De acordo com Hanson e Tan (1965), anticorpos e fragmentos de anticorpos correspondem a uma parte considerável das proteínas excretadas diariamente na urina. Pesquisas indicam que a urina contém imunoglobulinas que são antigenicamente semelhantes às imunoglobulinas séricas, incluindo vários tipos de anticorpos capazes de reagir a patógenos como *Vibrio cholera* e o vírus da poliomielite (Hanson; Tan, 1965).

Posteriormente, diversos autores foram capazes de caracterizar os isotipos de imunoglobulinas presentes na urina humana: Turner e Rowe (1967) – IgG, IgA secretora em indivíduos saudáveis; Bienenstock e Tomasi (1968) – IgG, IgA secretora em indivíduos saudáveis; Burdon (1970; 1971) IgG, IgD, IgA e IgA secretora em indivíduos saudáveis e IgM em pacientes com infecção urinária; Kaufman, Katz e McIntosh (1970) – IgA e IgA secretora em pacientes com infecção urinária; Kuriyama (1979) - IgG, IgM, IgA e IgA secretora em indivíduos saudáveis. Outro estudo menciona a medição de diferentes isotipos de anticorpos (IgG, IgM, IgA) na urina. Embora a IgM seja normalmente usada como um indicador de infecção precoce no soro, seu uso na urina é limitado devido a problemas de sensibilidade (Nagaoka *et al.*, 2021). A detecção de IgG4 é destacada como particularmente útil para melhorar a especificidade em testes de urina (Katsuragi *et al.*, 1998). A presença de cadeias leves de imunoglobulina na urina tem sido associada a infecções específicas, fornecendo uma nova abordagem para a detecção não invasiva de anticorpos (Hepojoki *et al.*, 2019).

Evidências científicas apoiam a viabilidade da urina como alternativa ao soro para detectar anticorpos específicos, particularmente no contexto de infecções virais como HIV e hantavírus. Um estudo demonstrou que amostras de urina podem efetivamente rastrear anticorpos contra o HIV, atingindo uma sensibilidade de 97,2% e especificidade de 100% quando comparadas às amostras de soro (Martinez *et al.*, 1996). Outro estudo em grande escala envolvendo quase 26.000 exames de urina confirmou a utilidade dos testes de anticorpos baseados na urina, revelando uma baixa taxa de falsos positivos de 1,3% em populações de alto risco (Urnovitz *et al.*, 1999).

Além disso, diversos outros estudos permitiram a identificação de anticorpos para várias doenças utilizando o método de ELISA, entre elas: filariose (Itoh *et al.*, 2001; Samad, 2013), hepatites A e C (Perry *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1994; Elsana *et al.*, 1998; Joshi *et al.*, 2002; Rodríguez-Lay *et al.*, 2003), esquistossomose (Itoh *et al.*, 2003; Elhag *et al.*, 2011), dengue (Itoh *et al.*, 2003; Vázquez *et al.*, 2007), estrogiloidíase (Eamudomkarn *et al.*, 2018; Chungkanchana *et al.*, 2022; Wongphutorn *et al.*, 2023), infecção por *Helicobacter pylori* (Gong, Li, Yuan, 2017), COVID-19 (Ludolf *et al.*, 2022; Ramos *et al.*, 2023a; Ramos, Pereira, Cardoso *et al.*, 2023b), leishmaniose tegumentar (Camara *et al.*, 2024), entre outras (Nagaoka *et al.*, 2021).

O mecanismo responsável pela presença de anticorpos na urina em diferentes patologias ainda não é compreendido. Um dos principais motivos é a disfunção renal, em que os rins não conseguem filtrar os resíduos e o excesso de proteínas de forma eficaz, permitindo que os anticorpos vazem para a urina, indicando uma possível doença renal. Além disso, a presença de anticorpos pode sinalizar uma resposta imune a infecções, como infecções do trato urinário (ITUs), em que o sistema imunológico produz anticorpos para combater os patógenos, resultando em sua detecção na urina (McKenzie; Young, 1987). Vários estudos demonstraram que as imunoglobulinas, incluindo IgA e IgG, são detectáveis na urina, indicando uma resposta imune a patógenos. Esse fenômeno é particularmente relevante em ITUs e infecções virais, nas quais a urina serve como meio de diagnóstico não invasivo (Jw; WI, 1972; McKenzie; Young, 1987).

Postulou-se que o limite de peso molecular (PM) para a filtração glomerular se situe entre 30 a 50 kDa (Roksnoer *et al.*, 2016), enquanto que a detecção da presença de albumina urinária (67 kDa) é amplamente reconhecida como um indicativo de lesões na barreira de filtração glomerular. As imunoglobulinas apresentam um PM maior: IgG, 150kDa; IgA ~385kDa; IgE 200kDa; IgD 180kDa; IgM, 900kDa (Muhammed, 2020). O peso molecular e a taxa de filtração glomerular (TFG) das imunoglobulinas, particularmente da IgG, são fatores importantes para compreender a sua presença na urina. Devido ao seu tamanho relativamente grande, a IgG normalmente não é filtrada livremente através da membrana basal glomerular em condições fisiológicas normais. No entanto, em certos estados patológicos, como danos glomerulares, o aumento da permeabilidade pode levar à presença de IgG na urina (Woo, *et al.*; 1979). Embora a concentração de anticorpos na urina corresponda

a apenas 1/4.000 a 1/10.000 daquela encontrada no soro (Nagaoka *et al.*, 2021), o uso de métodos diagnósticos não invasivos, como o ELISA baseado em urina, mostra grande potencial.

Estudos mais atuais, como o desenvolvido por Ludolf *et al.* (2022), demonstraram que é possível detectar anticorpos anti-SARS-CoV-2 em amostras de urina com alta sensibilidade (94%) e especificidade (100%) usando um ensaio de ELISA baseado em urina. Este método oferece uma alternativa não invasiva para avaliar a conversão imunológica ao COVID-19, podendo ser utilizado para monitorar a exposição ao vírus em nível populacional ou para avaliar o risco de infecção em nível individual.

Zhang *et al.* (2024) investigaram a detecção de anticorpos contra a proteína Spike do SARS-CoV-2 em urina, utilizando proteínas recombinantes expressas em sistemas procarióticos. Este estudo validou a eficácia do método, mostrando que a expressão procariótica das proteínas não compromete a eficiência do ensaio, tornando-o uma ferramenta conveniente para triagem de anticorpos anti-SARS-CoV-2. Outro trabalho recente identificou a presença de anticorpos urinários em pacientes com leishmaniose tegumentar utilizando antígeno recombinante e peptídeos sintéticos para o diagnóstico da doença (Camara *et al.*, 2024).

Embora os mecanismos que expliquem a presença de anticorpos na urina ainda não sejam completamente compreendidos, novas pesquisas são necessárias para explorar essas lacunas, visto que esse achado tem sido observado com frequência crescente nos estudos sobre doenças infecciosas nos últimos anos.

2.7.2 Urina no diagnóstico da hanseníase

O diagnóstico da hanseníase usando amostras de urina tem sido explorado com foco na detecção do DNA, antígenos e glicolípídeos específicos ao *M. leprae*. Desde a década de 1980, antígenos têm sido detectados na urina (Kaldany, 1986; Olcen, 1983; Singh, 1988). Kaldany *et al.* (1987) desenvolveram um ELISA de inibição para detectar o antígeno PGL-1 na urina de pacientes com hanseníase. A proteína foi identificada na maioria dos pacientes testados, e os autores sugeriram que a urina poderia ser considerada como um analito mais simples e sensível para o diagnóstico da hanseníase através da detecção de anticorpos específicos para PGL-1. Há relatos de detecção de antígenos específicos de *M. leprae*, PGL-1, em amostras de urina de

pacientes com hanseníase usando um método dot-ELISA (Singh, 1991). Ele identificou que os anticorpos policlonais detectaram 23% a 36% dos casos PB e 100% dos casos MB. Além disso, 16% dos casos de dimorfo tuberculóide (DT), 25% dos casos dimorfos (DD), 80% dos casos de DV e 100% dos VV foram detectáveis na urina. O estudo destacou o potencial do exame de urina para diagnosticar a hanseníase, incluindo casos negativos de esfregaço cutâneo (Singh, 1991). Outro trabalho observou a detecção do antígeno da parede celular de *M. leprae* na urina de pacientes tratados e não tratados usando o anticorpo monoclonal ML30A2 IgG (Sharma *et al.*, 1992).

Quanto à identificação de anticorpos urinários, os estudos são escassos e antigos. Um estudo coletou amostras de urina e soro de 67 indivíduos, sendo 55 com hanseníase ativa em diferentes formas e 12 controles saudáveis. Os casos de hanseníase foram classificados nas formas DV/VV, DD e TT/DT. Foram aplicados dois testes diferentes: o Teste de Competição de Anticorpos Urinários (UACT) e o Teste de Competição de Anticorpos Sanguíneos (SACT). O UACT, que utiliza anticorpos monoclonais, detecta anticorpos específicos para o antígeno de 35 kDa do *M. leprae* na urina. Já o SACT, também baseado em anticorpos monoclonais e direcionado ao mesmo antígeno de 35 kDa, foi realizado em amostras de soro. Os resultados mostraram que os anticorpos específicos foram detectados na urina de 50% dos indivíduos soropositivos. As taxas de positividade variaram conforme o tipo de hanseníase: 52% nos casos DV/VV, 50% nos DD e 43% nos TT/DT (Patil *et al.*, 1990).

Estudos recentes exploraram o uso de amostras de urina para o diagnóstico da hanseníase, com foco na detecção do DNA do *M. leprae* usando técnicas de PCR. Um estudo demonstrou a utilidade do Rlep-PCR na detecção do DNA do *M. leprae* em amostras de urina, mostrando uma taxa de positividade mais alta na urina em comparação com sangue e baciloscopia entre pacientes com hanseníase não tratados com esfregaço negativo. Isso sugere que a urina pode servir como uma ferramenta não invasiva de diagnóstico, particularmente para casos paucibacilares (David, 2024). Outro estudo utilizou PCR pra amplificar o gene do *M. leprae* em amostras de urina, alcançando uma taxa de detecção de 46,6% entre pacientes com hanseníase. Este método mostrou maior sensibilidade em casos de hanseníase tuberculóide, onde os métodos tradicionais frequentemente falham devido a baciloscopia negativa (Caleffi *et al.*, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antigênico da proteína quimérica recombinante M1, composta por epítopos de linfócitos B presentes em proteínas potencialmente específicas do *M. leprae*, para o diagnóstico laboratorial de formas paucibacilares e multibacilares de hanseníase usando soro e urina como amostras biológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os peptídeos sintéticos que compõem a proteína M1 usando amostras de urina dos pacientes para verificar a viabilidade do estudo.
- Avaliar a acurácia diagnóstica da quimera M1 por meio da técnica de ELISA utilizando painel de amostras de soro e urina de pacientes com formas paucibacilares e multibacilares de hanseníase, bem como de indivíduos sem comorbidades conhecidas e de pacientes com outras doenças infecciosas, como doença de Chagas, leishmaniose visceral (LV), leishmaniose tegumentar (LT), malária e de pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV).
- Avaliar parâmetros de sensibilidade e especificidade da proteína usando as amostras de urina e soro dos pacientes.
- Avaliar taxa de positividade nos controles do ELISA usando a proteína M1 na avaliação de amostras de contatos de casos paucibacilares e multibacilares da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) com número de protocolo CAAE-52767821.8.0000.5149, além da Instituição coparticipante Hospital Eduardo de Menezes (HEM; Belo Horizonte, Minas Gerais) com o número de protocolo CAAE 77392724.3.0000.5149. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Todos os procedimentos foram desenvolvidos de acordo com as normas éticas das Instituições envolvidas e obedecendo à Declaração de Helsinki de 1964 e suas alterações posteriores.

4.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Este estudo empregou 310 amostras pareadas de soro e urina, de conveniência. As amostras foram coletadas no período de fevereiro a setembro de 2024. A coleta de urina foi realizada tecnicamente em qualquer momento do dia, sem um horário fixo de retenção vesical; no entanto, recomendou-se a coleta de urina pela manhã ou após um período médio de retenção de aproximadamente 4 horas, sempre que possível. Para a coleta de urina, foram utilizados frascos coletores universais estéreis de 80 mL. O conteúdo coletado foi transferido para tubos de 15 mL contendo azida sódica (71289, Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) em uma concentração final de 0,1% (v/v). Esses tubos foram transportados em temperatura ambiente e armazenados em geladeira a 6°C, até o momento da utilização. As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção venosa, utilizando tubo estéril de coleta de 5 mL à vácuo com ativador de coágulo e gel separador. Posteriormente, os tubos foram submetidos a uma centrifugação a 3.500 rpm, durante 15 min a uma temperatura de 4°C. O soro resultante foi cuidadosamente coletado e armazenado em tubos do tipo eppendorf de 2 mL preservados a uma temperatura de -20°C, até o momento de utilização.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Um total de 310 amostras pareadas de soro e urina foram usadas nos testes de ELISA. Pacientes com hanseníase e outras doenças infecciosas foram recrutados no ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Minas Gerais e no CEDRI (Centro Especializado em Doenças Respiratórias e Infectocontagiosas) em Januária, Minas Gerais, Brasil.

4.3.1 Pacientes

4.3.1.1. Critérios de inclusão

Casos novos de hanseníase com mais de 18 anos que ainda não haviam iniciado o tratamento com poliquimioterapia no CEDRI Januária e HEM-Belo Horizonte.

4.3.1.2. Critérios de exclusão

- Hanseníase neural primária.
- Pacientes com hanseníase, sabidamente portadores de outras doenças infecciosas.
- Pacientes sabidamente com doenças renais.

4.3.1.3. Diagnóstico e classificação da doença

O diagnóstico da hanseníase foi realizado por critérios clínicos e epidemiológicos associados a testes laboratoriais. A classificação adotada no trabalho foi a operacional devido às coletas da região carente e endêmica de Januária/MG. Nesta região, a baciloscopia e histologia não estavam disponíveis para todos os pacientes e, portanto, a prioridade foi o uso desta classificação para fins de tratamento. Assim, casos com até cinco lesões de pele e baciloscopia obrigatoriamente negativa são classificados como PB e são tratados com PQT-U por seis meses. Casos com mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva são classificados como MB e devem receber PQT-U por 12 meses (Brasil, 2022). Além

disso, para casos com comprometimento de apenas um nervo, a OMS recomenda a classificação como MB, o mesmo proposto neste estudo (WHO, 2018). Os pacientes provenientes de Januária foram avaliados previamente por uma especialista em hansenologia no CEDRI e diagnóstico baseado na clínica e no exame dermatoneurológico. Todos os pacientes tiveram todo o tegumento inspecionado e realizada a palpação de nervos. Os outros pacientes oriundos do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes, centro de referência da doença em Belo Horizonte, foram avaliados com profissionais qualificados e com vasta experiência em hansenologia. Nesse serviço, além da avaliação clínica e exame dermatoneurológico, foi possível a realização da baciloscopia e biópsia com exame histológico. O exame dermatológico em ambas as coletas foi feito por médicos com experiência no atendimento de pacientes com hanseníase e avaliação neurológica seguiu as recomendações do Manual de Incapacidades do MS (Brasil, 2008).

Entre os 25 casos de pacientes paucibacilares; 13 casos foram do Hospital Eduardo de Menezes e 12 casos de Januária. Entre os 35 casos multibacilares; 09 oriundos do Hospital Eduardo de Menezes e 26 indivíduos de Januária. Todos os pacientes do HEM realizaram baciloscopia e apenas 13 pacientes dos pacientes multibacilares em Januária realizaram o exame. Além da baciloscopia, no HEM, foi realizado exame histopatológico. Portanto, foi possível classificar mais detalhadamente estes indivíduos. Utilizando a classificação de Ridley e Jopling neste local: 03 indivíduos apresentavam forma indeterminada; 06 pacientes a forma tuberculoide; 04 pacientes a forma dimorfa tuberculoide; 03 indivíduos com forma Dimorfa Virchowiana e 06 indivíduos com a forma virchowiana.

Entre os 22 pacientes do HEM; 14 eram do sexo feminino e 8 do sexo masculino. E entre os 38 casos de Januária; 27 eram do sexo feminino e 11 do sexo masculino.

Tabela 2 Indivíduos acometidos pela doença e suas diferentes formas clínicas

Paucibacilares	Multibacilares	Total de pacientes com hanseníase
25 casos	35 casos	60 casos
HEM: 13	HEM:9	
JANUÁRIA: 12	JANUÁRIA:26	

4.3.2 Controles

- Indivíduos sem comorbidades conhecidas e sem história progressiva ou familiar de tuberculose ou hanseníase, residentes em Belo Horizonte, Minas Gerais (n=55).
- Contatos intradomiciliares de casos de hanseníase PB ou MB que foram examinados no Ambulatório de Dermatologia do HEM ou CEDRI Januária e não apresentavam sinais e ou sintomas da doença no momento do exame. Esses indivíduos foram submetidos à avaliação clínica para verificar a possibilidade de estarem doentes. A avaliação incluiu anamnese, exame físico completo com exame dermatoneurológico. E o caso índice foi identificado para avaliar se era contato de paciente paucibacilar ou multibacilar. CPB (n=30) e CMB (n=35).
- Pacientes com as seguintes doenças infecciosas, que poderiam apresentar reação sorológica cruzada com hanseníase: doença de Chagas, LV, LT, HIV, malária. Em relação às reações cruzadas, foram selecionadas amostras de pacientes com LV (n=30), LT (n=35), doença de Chagas (n=35), malária (n=10) ou infectados com HIV (n=20). As amostras de pacientes com malária, doença de chagas e leishmaniose tegumentar foram oriundas da soroteca do grupo de pesquisa. As leishmanioses foram diagnosticadas por avaliação clínica e testes parasitológicos para LT (esfregaços corados com Giemsa de fragmentos de lesão e PCR para detectar kDNA de *L. braziliensis*) e LV (aspirados de baço e/ou medula óssea e PCR para detectar kDNA de *L. infantum*). A doença de Chagas foi diagnosticada por hemocultura, kit Chagatest® ELISA recombinante v.4.0 e/ou inibição da hemaglutinação Chagatest® (Wiener lab., Rosario,

Argentina). A malária foi diagnosticada por exame clínico e teste parasitológico positivo da análise microscópica de gotas de sangue coradas com Giemsa. A infecção pelo HIV foi baseada no ELISA e/ou teste rápido para HIV e confirmação com carga viral e contagem de células TCD4⁺. Os pacientes selecionados para o estudo não apresentavam disfunção renal.

Tabela 3 – Número de amostras analisadas por categoria de grupos controle do estudo. Grupos-controle. Foram analisadas 130 amostras de indivíduos para comparar com os grupos de doentes acometidos pela hanseníase; sendo indivíduos sem comorbidades conhecidas (n:55), indivíduos com outras doenças infecciosas (n:130) e contatos de pacientes com hanseníase (n:65). Fonte: elaboração própria (2024).

Indivíduos sem comorbidades (Controles)	Contatos	Outras doenças infectocontagiosas
(n=55)	CPB (n=30)	Doença de Chagas (n=35)
	CMB (n=35)	Malária (n=10)
		LT (n=35)
		LV (n=30)
		HIV (n=20)
Total: 55	65	130

4.4 PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

O gene que codifica a proteína quimérica M1 foi desenhado em estudo anterior (Assis *et al.*, 2024) e sintetizado comercialmente (GenScript®, EUA). As proteínas que compuseram a quimera M1 são ML0369, ML0447, ML0959 e ML2346, todas proteínas hipotéticas com similaridade 100% com o *M. leprae*. As regiões proteicas identificadas por programas de bioinformática como contendo epítopos de células B foram selecionadas para a construção das quimeras. A proteína M1 foi composta pelas sequências peptídicas: "IREPRNRVKQTAASHQ" da ML0369, "HHDIAAQTRREIYQNRSDR" da ML0447, "QVQQEKNRPDVRVDQHGNS" da

ML0959 e "RFAYVDQRKHSRYKPPNPAREGCFV" da ML2346. Esses peptídeos foram identificados em estudo recente, no qual foram também avaliados no diagnóstico sorológico da hanseníase (Assis *et al.*, 2024).

A expressão proteica foi induzida utilizando isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (1,0 mM; Promega®, Canadá) e as culturas foram incubadas por 24 h a 12°C, momento em que foram rompidas por ultrassom, com seis ciclos de 30 seg cada, em 90 MHz. A proteína M1 foi purificada por cromatografia de afinidade na coluna de níquel HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences, EUA), e a amostra purificada obtida foi dialisada contra solução salina tamponada com fosfato 1x (PBS). Após a diálise, a proteína M1 foi passada sobre uma coluna de agarose-polimixina (Sigma-Aldrich, EUA) para remover qualquer endotoxina bacteriana residual. A concentração de proteína M1 foi medida usando um método colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA) com o kit *BCA Protein Assay Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os quatro epítomos de células B que compõem a proteína quimérica foram sintetizados quimicamente (Scussel *et al.*, 2022). Os mesmos foram liofilizados e armazenados a -20°C, até o uso, quando foram reconstituídos em água milli-Q na concentração final de 1,0 mg/mL.

4.5 ELISA

A metodologia de ELISA indireta foi realizada seguindo as condições experimentais ideais para cada tipo de antígeno utilizado a proteína recombinante M1 e os peptídeos sintéticos, aplicando como amostras biológicas a urina e soro dos pacientes. Inicialmente, em todos os casos, curvas de titulação foram realizadas com o propósito de determinar as concentrações mais apropriadas dos antígenos e diluição da urina, soro e conjugado para os experimentos.

4.5.1 ELISA usando soro

Curvas de titulação prévias foram realizadas visando atingir a concentração de antígeno mais apropriada e as diluições de amostra e conjugado a serem utilizadas. Placas flexíveis de imunoensaio de microtitulação (Cralplast, São Paulo, Brasil) foram revestidas com M1 (0,25 μ g por poço) ou peptídeos sintéticos individuais (10,0 μ g por

poço, cada), todos diluídos em tampão de revestimento (tampão carbonato 50 mM) a pH 9,6 por 16 h a 4 °C. Após, os sítios de ligação livres foram bloqueados com 250 µL de PBS (1x) pH 7,4 mais Tween 20 (PBS-T) adicionado de 5% (p/v) de albumina de soro bovino por 1 h a 37 °C. Após a lavagem das placas cinco vezes com PBS-T, os poços foram incubados com 100 µL de amostras de soro (diluídas em PBS-T na proporção 1:200) por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes em PBS-T e incubadas com anticorpo conjugado com peroxidase de rábano anti-IgG humana (diluído em PBS-T na proporção 1:10.000; catálogo A18811, Invitrogen, EUA) por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e as reações foram desenvolvidas usando TMB (3,3',5,5'; tetrametilbenzidina linear, Scienco, Brasil) por 7 min e no escuro. As reações foram interrompidas pela adição de 50 µL de H₂SO₄ 2 N, e os valores de densidade óptica (DO) foram medidos em um leitor de microplacas ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canadá), a 450 nm. As amostras foram utilizadas no mesmo dia com os mesmos reagentes para reduzir a interferência experimental entre os resultados obtidos. Uma análise gráfica de Bland-Altman também mostrou que as diferenças nos valores de DO entre as duplicatas não aumentaram com a variação dos resultados. Dois procedimentos ELISA diferentes foram realizados, utilizando as mesmas amostras de soro em dois experimentos independentes.

4.5.2 ELISA usando urina

Curvas de titulação também foram realizadas para determinar a concentração de antígeno mais apropriada e as diluições de amostra e conjugado a serem usadas. Placas de imunoenensaio de microtitulação (Thermo Fisher, São Paulo, Brasil) foram então revestidas com M1 (1,0 µg por poço) ou peptídeos sintéticos individuais (20,0 µg por poço, cada), todos diluídos em tampão de revestimento a pH 9,6 por 16 h a 4 °C. Depois, os sítios de ligação livres foram bloqueados com 250 µL de PBS-T adicionado com 5% (p/v) de albumina de soro bovino por 1 h a 37 °C. Depois, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e os poços foram incubados com 100 µL de urina não diluída por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes em PBS-T e incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado com peroxidase de rábano (diluído 1:1000 em PBS-T; catálogo A18811, Invitrogen, EUA) por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas seis vezes com PBS-T e as reações foram reveladas usando

TMB por 7 min e no escuro. As reações foram interrompidas após a adição de 50 μ L de H₂SO₄ 2 N, e os valores de DO foram medidos em um leitor de microplacas ELISA, a 450 nm.

As amostras foram usadas no mesmo dia com os mesmos reagentes para reduzir a interferência experimental entre os resultados obtidos. Além disso, uma análise de diagrama de Bland-Altman também foi realizada, bem como dois procedimentos de ELISA usando as mesmas amostras em experimentos independentes.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram inseridos em planilhas do Microsoft Excel (versão 10.0) e analisados com o GraphPad Prism versão 10.0.2 para Windows (GraphPad Software, EUA). Os valores de corte foram estabelecidos pela construção de curvas *Receiver Operating Characteristic* (ROC) e o desempenho diagnóstico dos antígenos foi avaliado através de: sensibilidade (Se), especificidade (Sp), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e intervalo de confiança de 95% (IC95%). Análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Dunnett foram usados para comparações entre os grupos ($p < 0,05$). A concordância além do acaso foi avaliada usando o coeficiente Kappa e interpretada de acordo com a escala: 0,00 a 0,20 (desprezível), 0,21 a 0,40 (fraco), 0,41 a 0,60 (moderado), 0,61 a 0,80 (bom) e 0,81 a 1,00 (excelente) (Cohen, 1968).

5 RESULTADOS

As seções de Resultados e Discussão serão apresentadas sob a forma de artigo científico, que foi derivado do projeto; conforme estabelecido pela Resolução nº 02/2013, de 18 de setembro de 2013 do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

O artigo foi submetido aceito e publicado no jornal *Tuberculosis* [ISSN: 1873-281X], Recebido em 31 de outubro de 2024; Recebido em formato revisado em 23 de janeiro de 2025; Aceito em 3 de fevereiro de 2025.

Citação do artigo: Câmara RSB, Pereira IAG, Espíndola GC, Lage DP, Silva AL, Freitas CS, Assis BPN, Corrêa LVA, Moreira RLF, Lyon S, Silva RC, Barros TS, de Oliveira ALG, Ludolf F, Chávez-Fumagalli MA, Christodoulides M, Machado-de-Ávila RA, Tupinambás U, Gonçalves DU, da Costa Rocha MO, Coelho EAF, Chaves AT. Urine-based ELISA using a recombinant chimeric protein for the diagnosis of paucibacillary and multibacillary leprosy. *Tuberculosis* (Edinb). 2025 Mar;151:102613. doi: 10.1016/j.tube.2025.102613. Epub 2025 Feb 6. PMID: 39923466.

Title

Urine-based ELISA using a recombinant chimeric protein for the diagnosis of paucibacillary and multibacillary leprosy

Authors

Raquel S.B. Câmara^{a,#}, Isabela A.G. Pereira^{a,#}, Geise C. Espíndola^{a,#}, Daniela P. Lage^a, Ana L. Silva^a, Camila S. Freitas^a, Bárbara P.N. Assis^{a,b}, Laís V.A. Corrêa^a, Ricardo L.F. Moreira^b, Sandra Lyon^b, Rozana C. Silva^b, Tiago S. Barros^b, Ana Laura G. de Oliveira^a, Fernanda Ludolf^{a,c}, Miguel A. Chávez-Fumagalli^d, Myron Christodoulides^e, Ricardo A. Machado-de-Ávila^f, Unaí Tupinambás^a, Denise U. Gonçalves^a, Manoel O. da Costa Rocha^a, Eduardo A.F. Coelho^{a,g,*,#}, Ana T. Chaves^{a,#}

Affiliations

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo

Horizonte, 30130-100, Minas Gerais, Brazil.

^b Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, 30622-020, Minas Gerais, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-110, Minas Gerais, Brazil.

^d Computational Biology and Chemistry Research Group, Vicerrectorado de Investigación, Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, 04000, Peru.

^e Neisseria Research Group, Molecular Microbiology, School of Clinical and Experimental Sciences, University of Southampton Faculty of Medicine, Southampton General Hospital, Southampton, England.

^f Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 88806-000, Santa Catarina, Brazil.

^g Departamento de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

These authors contributed equally for the study.

***Corresponding author**

Address: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Laboratório de Pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Prof. Alfredo Balena, 190, 30130-100, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Phone and fax number: +55 31 3409 4983

E-mail address: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

ABSTRACT

Leprosy diagnosis is difficult to perform due to variable sensitivity and/or specificity of the tests. In addition, the collection of the blood samples requires laboratorial structure and trained professionals. In the present study, the diagnostic efficacy of M1 chimeric protein, which was recently showed to be antigenic for leprosy using a serum- based ELISA, was evaluated against patient urine. Paired serum and urine samples were collected from patients with paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) leprosy, tegumentary and visceral leishmaniasis, tuberculosis, Chagas disease, malaria, and HIV-infected subjects. Samples from healthy individuals and household contacts were also used. The protein and peptides used to compose it were used as antigens, and results showed that the four peptides presented good sensitivity and specificity to detect MB leprosy, while M1 protein showed sensitivity and specificity of 98.5 % and 100 %, respectively, to detect both PB and MB leprosy, when an urine-based ELISA was performed. Positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were 100 % and 98.3 %, respectively. In a serum-based ELISA, sensitivity and specificity were 96.9 % and 100 %, respectively, with PPV and NPV of 100 % and 96.5 %, respectively. In conclusion, preliminary data suggest that M1 protein could be considered for diagnosis of leprosy by using patient urine.

Keywords: Leprosy; chimeric protein; diagnosis; ELISA; urine; serum.

1. Introduction

Leprosy, also known as Hansen's disease is an infectious disease that remains endemic in more than 140 countries around the world (WHO, 2023). The intracellular bacterium *Mycobacterium leprae* is considered the etiological agent of leprosy, although *M. lepromatosis* has been associated with diffuse lepromatous disease in Mexican patients (Han et al., 2008; Sugawara-Mikami et al., 2022). The disease transmission is mainly dependent on the bacillus infectivity, host's immune response, and by frequency and duration of contact among uninfected subjects and patients (Chen et al., 2022). The skin and peripheral nervous system and reticuloendothelial systems are affected by development of active disease, although the upper respiratory tract, bones and joints, eyes, and adrenal glands can be also affected (Maymone et al., 2020).

Leprosy is a polymorphic disease that presents different clinical forms, according to the host's immune response to the infection. In the 1960s, Ridley and Jopling proposed a classification, for use in research, which reflects the host's resistance spectrum. This classification recognizes five clinical forms of the disease and is based on clinical, histopathological, immunological (Mitsuda test) and bacteriological (smear microscopy) criteria. At the beginning of the spectrum is tuberculoid form (TT), which presents a predominantly cellular immune response and good host resistance to infection. The dimorphic group is found in the center of the spectrum, and presents intermediate resistance, being subdivided into dimorphic-tuberculoid (DT), dimorphic-dimorphic (DD) and dimorphic-lepromatous (DV) according to the proximity to one of the poles. Virchowian cases (VV) are at the end of the spectrum, presenting a predominantly humoral immune response and low host resistance to infection (Ridley; Jopling, 1966). The indeterminate form (I) is the initial form of the disease and cannot be classified within the spectrum, since the host's immune response has not been still defined (Ridley; Jopling, 1966). In this phase, the condition is exclusively cutaneous and there is no neural involvement. If left untreated, this form can evolve into any of the spectral forms and, in these cases, peripheral neuropathy may develop if treatment is not instituted promptly (Thalhari, 2015; Cruz et al, 2017). Primary neural leprosy (PN), also known as neuritic, polyneuritic or pure neural leprosy, is the clinical form characterized by peripheral neuropathy, without current or previous evidence of skin lesions and negative bacilloscopy. Its clinical

diagnosis is based on the presence of sensory and/or motor deficiency and neural thickening (Mendiratta, 2006). The disease classification has been a matter of controversy. The high prevalence of this clinical form in India (5.0 %–17.7 % of cases) justified the inclusion of the NP form as an independent group in the classification of the Indian Association of Leprologists (Talwar, 1992). Ridley and Jopling [6] did not include the NP form as a separate group in their spectral classification. The authors reported that, although the NP form is more common in TT, it can occur in any of the groups, with the exception of VV. In 1981, the World Health Organization (WHO) recommended the first operational classification to serve as basis for the implementation of MDT. Multibacillary (MB) leprosy included the VV, DV and DD forms of the Ridley and Jopling classification, with a bacilloscopic index (BI) higher than or equal to 2 at any site. Paucibacillary (PB) leprosy included the I, TT and DT forms, with $BI < 2$ at all sites.

Diagnosis of disease is based on clinical and laboratorial exams (Maymone et al., 2020). However, the clinical diagnosis requires expertise of clinicians and laboratorial diagnosis presents variable sensitivity and/or specificity of the tests (Aamir et al., 2018). In this context, an early and precise diagnosis is essential to interrupt the subclinical infection and disease transmission chain, as well as to prevent disfigurement and disability in the patients. Laboratory tests, such as Polymerase Chain Reaction (PCR), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Rapid-Diagnostic Tests (RDT) have been performed, but variable sensitivity and/or specificity has been still reported. In addition, there is the difficulty to obtain blood samples, which require trained professionals and laboratorial equipment (Martinez et al., 2014; Lopes-Luz et al., 2023), as well as represents a challenge in remote and restricted areas to healthcare (Eamudomkarn *et al.*, 2018; Albuquerque *et al.*, 2023).

The laboratorial diagnosis of leprosy is based on the use of techniques, such as Polymerase Chain Reaction (PCR), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Rapid-Diagnostic Tests (RDTs); however, variable results have been obtained. Additionally, there is the difficulty to collect patient blood samples, since such procedure requires trained professionals and laboratorial structure; which represent a challenge in remote areas where limitations in the healthcare are found (Martinez, 2014; Eamudomkarn *et al.*, 2018; Albuquerque *et al.*, 2023; Lopes-luz *et al.*, 2023).

In this context, other analytes, such as saliva, oral swab, nasal secretion, urine, among others, could be also considered for the evaluation of the specific antibodies to

diagnosis diseases (Mwape *et al.*, 2011; Ghosh *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2018; Andama *et al.*, 2022). Urine is a biological liquid produced by the kidneys and that contains metabolites, salts, proteins, pigments, and other valuable molecules from the surrounding blood capillaries. It not only reflects information from the kidneys and urinary tract but also incorporates products from more distinct organs of patient's body, obtained in plasma through glomerular filtration (Sereno *et al.*, 2020).

Urine-based ELISA has been developed to detect distinct infections and diseases, such as *Helicobacter pylori* (Gong *et al.*, 2017), Chikungunya virus (Raut *et al.*, 2016), human immunodeficiency virus-1 (Oelemann *et al.*, 2022), visceral leishmaniasis (Ghosh *et al.*, 2016; Eyayu *et al.*, 2022), tegumentary leishmaniasis (Câmara *et al.*, 2024a; Câmara *et al.*, 2024b), *Wuchereria bancrofti* (Samad *et al.*, 2013), and *Schistosoma japonicum* (Lei *et al.*, 2012), among others. In this context, the perspective to use this analyte to detect specific antibodies to diagnose leprosy could be considered as a strategy. In a recent study, a new recombinant chimeric protein, called M1, which is composed by four specific B-cell epitopes from *M. leprae* proteins; was showed to be antigenic for the serodiagnosis of both PB and MB leprosy cases with four specific B-cell epitopes from *M. leprae* proteins, and it showed to be a promising antigenic candidate for the serological diagnosis of PB and MB leprosy cases (Assis *et al.*, 2024) In this context, in the present study, M1 protein was tested against paired urine and serum samples from PB and MB patients, as well as from their contactants and healthy subjects, besides patients with cross-reactive diseases (CRD); aiming to verify the diagnostic efficacy of this protein by using patient urine. To the best of our knowledge, this is the first study in which patient urine was tested against a chimeric protein for the diagnosis of both PB and MB leprosy cases.

2. Materials and Methods

2.1. Production of recombinant M1 protein and peptide synthesis

The gene encoding M1 protein was recently constructed (Assis *et al.*, 2024). The protein expression was performed after addition of 1.0 mM of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; Promega®, Canada) and incubation for 24 h at 12°C, when cells were disrupted by ultrasonication through six cycles of 30 s each, at 90 MHz. M1 protein was purified by affinity chromatography on the HisTrap HP nickel column (GE Healthcare Life Sciences, USA), and dialyzed using PBS. After dialysis,

the antigen was passed over an agarose-polymyxin column (Sigma-Aldrich, USA) in order to remove any residual endotoxin content. Protein concentration was estimated by using the BCA protein assay reagent kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) according to manufacturer instructions. The four synthetic peptides used to construct the M1 chimeric protein were chemically produced according described [30]. They were lyophilized and stored at 20°C until use, when were reconstituted in Milli-Q water, at a final concentration of 1.0 mg/mL.

2.2. Ethics

The study was approved by the Ethics Committee on Human Research from Federal University of Minas Gerais (UFMG; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), with protocol number CAAE- 52767821.8.0000.5149. All participants signed an informed consent form. Urine samples (10 mL) were collected into a tube containing preservative (0.1 % w/v NaN₃; catalog 71289, Sigma-Aldrich, USA), and they were stored at 4°C until use. Blood samples (10 mL) were collected through venipuncture in tubes with no anticoagulant, which were incubated for 15 min at 37°C, and submitted for centrifugation at 5000×g for 10 min at 22°C. Thus, sera samples were separated and stored at 70°C, until use.

2.3. Study population

A total of 310 subjects were enrolled in the study. Paired urine and serum samples from PB (n = 25) and MB (n = 35) patients, as well as from their household contacts [PBC (n = 30) and MBC (n = 35), respectively] were collected. In addition, paired samples from healthy subjects living in an endemic region of disease (n = 55; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil), as well as of patients with visceral (n = 30) and tegumentary (n = 35) leishmaniasis, Chagas disease (n = 35), malaria (n = 10) and those HIV-infected (n = 20) were also used in the experiments.

2.4. Diagnosis of diseases

The diagnosis of leprosy was performed by clinical evaluation, slit-skin smears and histopathological examination of lesion biopsy. Patients were classified according to WHO criteria. People living with leprosy patients were called household contacts and they were enrolled in the study. These subjects did not present clinical signal of disease at the moment of collection of the urine and serum samples. Healthy subjects,

which did not present clinical signal of leprosy or other infectious diseases at the moment of collection of samples, were also used.

Regarding the cross-reactive diseases, leishmaniasis was diagnosed by clinical evaluation and parasitological test for TL (Giemsa-stained smears from lesion fragments and PCR to detect *L. braziliensis* kDNA) and VL (aspirates from spleen and/or bone marrow and PCR to detect *L. infantum* kDNA). Chagas disease was diagnosed by hemoculture, Chagatest® recombinant ELISA v.4.0 kit and Chagatest® hemmagglutination inhibition (Wiener lab., Rosario, Argentina), while malaria was diagnosed through clinical evaluation and positive parasitological test through microscopy from Giemsa-stained blood drops. HIV infection was confirmed by clinical evaluation of the patients, as well as by laboratorial tests comprising CD4+ and CD8+ T cell subtypes count, rapid serologic test for detection of anti-HIV IgG antibodies and evaluation of viral load.

2.5. Serum-based ELISA

Previous titration curves were performed aiming to reach the most appropriate antigen concentration and sample and conjugate dilutions to be used. Flexible microtiter immunoassay plates (Cralplast, São Paulo, Brazil) were coated with M1 (0.25 µg per well) or individual synthetic peptides (10.0 µg per well, each), all diluted in coating buffer (50 mM carbonate buffer) at pH 9.6 for 16 h at 4°C. After, free binding sites were blocked with 250 µL of PBS (1x) pH 7.4 plus Tween 20 (PBS-T) added with 5 % (w/v) bovine serum albumin for 1 h at 37°C. After washing the plates five times with PBS-T, wells were incubated with 100 µL of sera samples (1:200 diluted in PBS-T) for 1 h at 37°C. Plates were washed six times in PBS-T, and incubated with anti-human IgG horseradish-peroxidase conjugated antibody (1:10,000 diluted in PBS-T; catalog A18811, Invitrogen, USA) for 1 h at 37°C. Plates were washed six times with PBS-T, and reactions were developed using TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine linear, Scienco, Brazil) for 7 min and in the dark. Reactions were stopped by adding 50 µL of 2N H₂SO₄, and the optical density (OD) values were measured in an ELISA microplate reader (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada), at 450 nm. Samples were used on the same day with the same reagents to reduce experimental interference between the results obtained. A Bland-Altman plot analysis also showed that differences in the OD values between the duplicates did not increase with the variation of their results. Two different ELISA procedures were carried out, using the same sera

samples in two independent experiments (data not shown).

2.6. Urine-based ELISA

Titration curves were also performed to determine the most appropriate antigen concentration and sample and conjugate dilutions to be used. Microtiter immunoassay plates (Thermo Fisher, São Paulo, Brazil) were then coated with M1 (1.0 μ peptides (20.0 for 16 h at 4 μ g per well) or individual synthetic g per well, each), all diluted in coating buffer at pH 9.6°C. After, free binding sites were blocked with 250 μ L of PBS-T added with 5 % (w/v) bovine serum albumin for 1 h at 37 μ °C. After, plates were washed five times with PBS-T and wells were incubated with 100L undiluted urine for 1 h at 37°C. Plates were washed six times in PBS-T and incubated with anti-human IgG horseradish-peroxidase conjugated antibody (1:1000 diluted in PBS-T; catalog A18811, Invitrogen, USA) for 1 h at 37°C. Plates were washed six times with PBS-T and reactions were developed using TMB for 7 min and in the dark. Reactions were stopped after addition of 50 μ L of 2NH₂SO₄, and the OD values were measured in an ELISA microplate reader, at 450 nm. Samples were used on the same day with the same reagents to reduce experimental interference between the results obtained. In addition, a Bland-Altman plot analysis was also performed, as well as two ELISA procedures using the same samples in independent experiments (data not shown).

2.7. Statistical analysis

Results were entered into Microsoft Excel (version 10.0) spreadsheets and analyzed with GraphPad Prism version 10.0.2 for Windows (GraphPad Software, USA). The cut-off values were established by constructing Receiver Operating Characteristic (ROC) curves. The diagnostic performance of M1 antigen was evaluated by calculating: sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and 95% confidence interval (95%CI). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett post-test were used to for multiple comparisons between groups ($P < 0.05$). Agreement beyond chance was assessed using the Kappa coefficient and interpreted according to the following scale: 0.00 to 0.20 (negligible), 0.21 to 0.40 (weak), 0.41 to 0.60 (moderate), 0.61 to 0.80 (good), and 0.81 to 1.00 (excellent) (Cohen, 1968).

3. Results

3.1. Reactivity of the synthetic peptides against patient urine samples

Initially, we performed an ELISA experiment to evaluate if the synthetic peptides representing the chimeric protein could be reactive against both PB and MB patient urine samples, as well as from their household contacts and healthy subjects. We used 15 urine samples from each subject and patient, and found that MB patients presented high reactivity against the synthetic peptides, when compared to the other groups (Fig. 1).

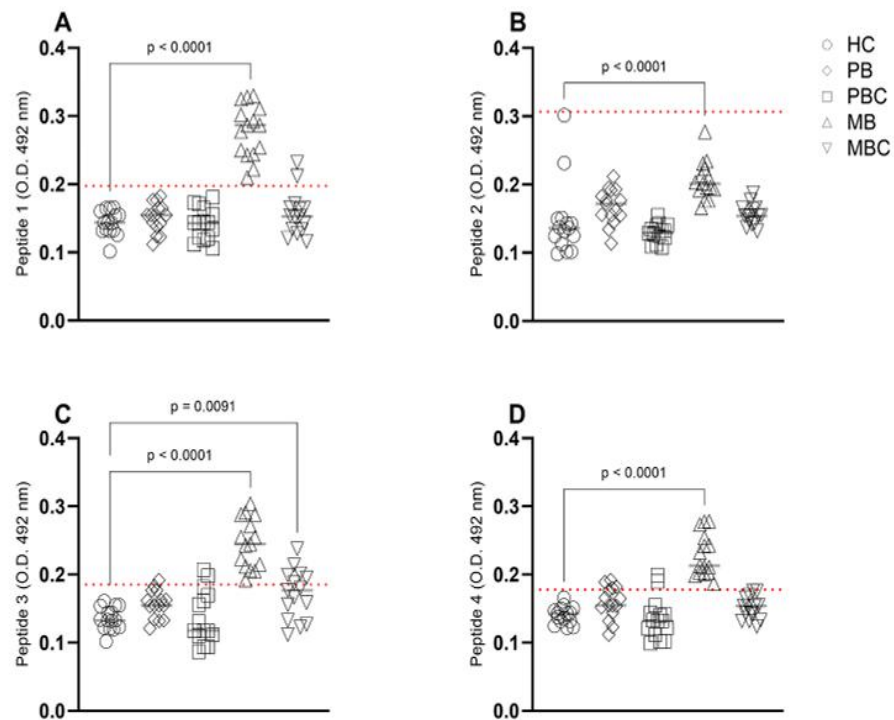


Fig. 1. Urine-based ELISA using the synthetic peptides. ELISA experiments were performed using the individual synthetic peptides, which were reacted against urine samples from healthy subjects (HC; $n = 15$), as well as from patients with paucibacillary (PB; $n = 15$) and multibacillary (MB; $n = 15$) leprosy, and their household contactants (PBC and MBC, respectively; $n = 15$ each). The individual optical density (OD) values are shown for each antigen: Peptide 1 (A), Peptide 2 (B), Peptide 3 (C) and Peptide 4 (D). The dotted lines indicate the cut-off values, which were calculated by the mean absorbance from healthy subjects group plus three-times the standard deviation. P values were calculated and differences are indicated.

Otherwise, PB patient samples showed lower antibody reactivity, although the OD values have been higher in comparison to those found in their contactants and healthy subjects. ROC curves were calculated with the OD data, and sensitivity values to differentiate leprosy patients from the others were of 93.8 %, 33.4 %, 82.6 %, and 94.5 %, when Peptide 1, Peptide 2, Peptide 3 and Peptide 4 were used, respectively; while specificity was of 57.6 %, 41; 2 %, 56.7 %, and 64.4 %, respectively (Table 1).

Table 1. Diagnostic evaluation of the synthetic peptides against patient urine and serum samples. Experiments were developed using the synthetic peptides against paired urine and serum samples from healthy subjects (n =15), as well as of patients with paucibacillary (n =15) and multibacillary (n =15) leprosy, and their household contactants (n =15, each case). The individual optical (OD) values were obtained and used to calculate the Receiver Operator Characteristic (ROC) curves. The diagnostic evaluation of the peptides was evaluated through: sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), confidence interval (CI95 %), Kappa coefficient, and Youden index (Y).

Antigens	Fisher's test	Se	95%CI	Sp	CI95 %	PPV	CI95 %	NPV	CI95 %	Kappa	Y
Peptide 1	0.001	93.8	72.6-98.7	57.6	41.2-71.5	51.5	33.15-66.85	96.6	79.2-99.3	0.58	0.53
Peptide 2	0.05	33.4	22.5-48.8	41.2	26.5-59.7	48.7	33.8-64.6	86.5	77.8-98.7	0.44	0.39
Peptide 3	0.003	82.6	65.4-91.2	56.7	39.6-72.3	53.3	36.14-69.77	86.6	68.5-92.3	0.50	0.48
Peptide 4	0.0001	94.5	77.6-99.5	64.4	47.6-79.5	63.33	45.51-78.13	96.2	79.2-99.3	0.67	0.58

3.2. Serological evaluation from M1 protein for the diagnosis of leprosy

We recently showed some promising results using M1 protein for the serodiagnosis of both PB and MB leprosy (Assis *et al.*,2024). In the present work, we used patient urine and serum samples to validate the diagnostic efficacy of this chimeric antigen, as well as by possibility to use urine as an alternative biological analyte to diagnose leprosy. Paired 310 samples were evaluated in ELISA experiments, and results obtained through a serum-based ELISA showed that all PB and MB sera samples reacted against M1 presented OD values above of the cut-off, suggesting a positive diagnostic role for this antigen (Fig. 2).

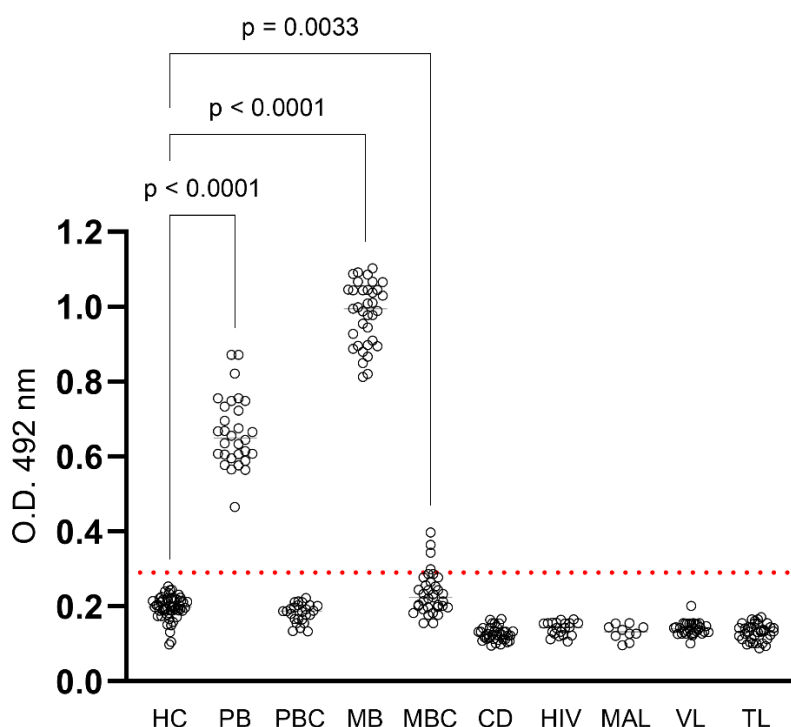


Figure 2 - Serum-based ELISA using M1 protein for the diagnosis of leprosy.

ELISA experiments were performed using the M1 protein, which was reacted against sera samples from healthy subjects (HC; n =55), as well as of patients with paucibacillary (PB; n =25) and multibacillary (MB; n =35) leprosy, and their household contacts (PBC and MBC, n =30 and n =35, respectively). In addition, samples from patients with visceral (VL; n =30) and tegumentary (TL; n =35) leishmaniasis, Chagas disease (CD; n =35), malaria (MAL; n =10) and HIV-infected (HIV; n =20) were used. The individual optical density (OD) values are shown, as well as the dotted line that indicate the cut-off value, which was calculated by the mean absorbance obtained from healthy subjects group plus three-times the standard deviation. P values were calculated and differences are shown.

Evaluating the other groups, some serum samples collected from MB contacts showed also high reactivity against M1, suggesting the occurrence of false-positive result or by initial development of a subclinical infection in these individuals. With the individual OD values, ROC curves were constructed, and sensitivity and specificity values to discriminate between PB and MB leprosy patients from healthy subjects and cross-reactive diseases (CRD group) patients were both 100 %; while values of 94.2 % and 100 % were obtained to discriminate between leprosy patients and their contactants, respectively (Table 2). The PPV and NPV values to discriminate between PB and MB leprosy patients from healthy subjects and CRD patients were both of 100 %, while the values to discriminate between leprosy patients from their contactants were of 100 % and 93.3 %, respectively.

Table 2 - Diagnostic performance of the M1 protein against patient serum samples. Sera samples were collected from healthy subjects (HC group; n =55), and from patients with paucibacillary (PB; n =25) and multibacillary (MB; n =35) leprosy, which composed the leprosy (LEP) group. Samples from their household contacts (PBC and MBC, n =30 and n =35, respectively) were also used in reaction against M1 protein. A group composed by cross-reactive diseases (CRD group) was based on serum samples of patients with visceral (VL; n =30) and tegumentary (TL; n =35) leishmaniasis, Chagas disease (CD; n =35), malaria (MAL; n =10) and HIV-infected (HIV; n =20). The individual optical (OD) values were obtained and used to calculate Receiver Operator Characteristic (ROC) curves, which determined: sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), confidence interval (CI95 %), Kappa coefficient, and Youden index (Y). Ab abbreviations: LEP: leprosy; HC: healthy controls; CRD: cross-reactive diseases.

Groups	Fisher's test	Se	95%CI	Sp	CI95%	PPV	CI95%	NP		Kapp	
								V	CI95%	a	Y
LEP x Healthy	<0.0001	100	94.4-100	100	93.5-100	100	94.4-100	100	93.5-100	1.0	1.0
LEP x Contacts	<0.0001	94.2	86.0-97.7	100	93.6 -100	100	94.4-100	93.3	84.1-97.4	0.9	0.92
LEP x CRD	<0.0001	100	94.4 -100	100	96.1-100	100	94.4-100	100	96.11-100	1.0	1.0

3.3. Urine-based ELISA using M1 protein for the diagnosis of leprosy

We tested patient urine against M1 protein in ELISA experiments, and results showed that all samples from both PB and MB leprosy patients showed individual OD values above the cut-off, suggesting also a promising diagnostic role of this protein to diagnose leprosy by patient urine (Fig. 3). Similarly to found when patient serum was used; some urine samples of MB contactants presented also high reactivity against M1, suggesting either the occurrence of false-positive result or a subclinical infection. With the individual OD values, ROC curves were constructed and used to evaluate the diagnostic performance of M1 using patient urine. Results showed both 100 % sensitivity and specificity to discriminate between PB and MB leprosy patients from healthy subjects and CRD patients; while they were of 97.0 % and 100 %, respectively, to discriminate between leprosy patients from their contactants (Table 3). The PPV and NPV values to differentiate between leprosy patients from healthy subjects and CRD patients were both of 100 %; while these calculated to differentiate leprosy patients from their contactants were of 100 % and 96.7 %, respectively.

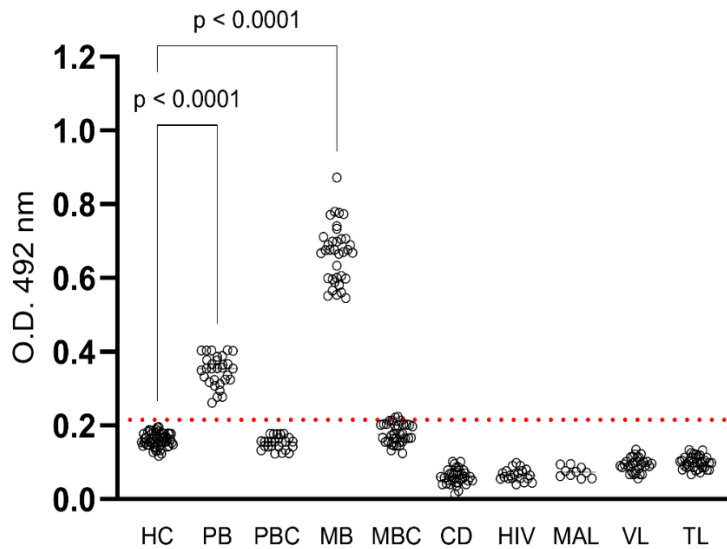


Fig. 3. Reactivity of M1 protein against patient urine samples. ELISA experiments were performed using the M1 antigen, which was reacted against urine samples from healthy subjects (HC; n =55), as well as of patients with paucibacillary (PB; n =25) and multibacillary (MB; n =35) leprosy, and their household contacts (PBC and MBC, n =30 and n =35, respectively). In addition, urine samples collected from patients with visceral (VL; n =30) and tegumentary (TL; n =35) leishmaniasis, Chagas disease (CD; n =35), malaria (MAL; n =10) and HIV-infected (HIV; n =20) were used. The individual optical density (OD) values are shown, as well as the dotted line that indicates the cut-off value, which was calculated by the mean absorbance obtained from healthy subjects group plus three-times the standard deviation. P values were calculated and differences are shown.

Table 3 Diagnostic assay using M1 antigen against patient urine samples. Urine samples were collected from healthy subjects (HC group; n =55), and from patients with paucibacillary (PB; n =25) and multibacillary (MB; n =35) leprosy, which composed the leprosy (LEP) group. Samples from their household contacts (PBC and MBC, n =30 and n =35, respectively) were also used in reaction against M1 protein. A group composed by cross-reactive diseases (CRD group) was based on serum samples of patients with visceral (VL; n =30) and tegumentary (TL; n =35) leishmaniasis, Chagas disease (CD; n =35), malaria (MAL; n =10) and HIV-infected (HIV; n =20). The individual optical (OD) values were obtained and used to calculate Receiver Operator Characteristic (ROC) curves, which determined: sensitivity (Se), specificity (Sp), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), confidence interval (CI95 %), Kappa coefficient, and Youden index (Y). Abbreviations: LEP: leprosy; HC: healthy controls; CRD: cross-reactive diseases.

Groups	Fisher's test	Se	95%CI	Sp	CI95%	PPV	CI95%	NP	CI95%	Kappa	Y
LEP x Healthy	<0.0001	100	94.4-100	100	93.5-100	100	94.4-100	100	93.5-100	1.0	1.0
LEP x Contacts	<0.0001	97.0	89.8-99.5	100	93.8-100	100	94.4-100	96.7	88.6-99.4	0.9	0.98
LEP x CRD	<0.0001	100	94.4-100	100	96.1-100	100	94.4-100	100	96.11-100	1.0	1.0

4. Discussion

The diagnosis of leprosy is based on the clinical examination, which requires medical expertise and through laboratorial tests that present variable sensitivity and/or specificity (Maymone et al., 2020). Such conditions hamper an early and precise diagnosis of the disease, making difficult to a rapid and effective treatment, as well as to the interruption of transmission chain between patients and their contacts (Aamir et al., 2018). For the serological diagnosis, Myco bacterium proteins have been tested in a recombinant format, such as phenolic glycolipid I (Carvalho et al., 2015), disaccharide linked to human serum albumin via an octyl (NDO-HSA) disaccharide linked to human serum albumin via an octyl (NDO-HSA) (Marçal et al., 2018), leprosy IDRI diagnostic-1 (LID-1) (Jian et al., 2020), and natural disaccharide octyl-Leprosy IDRI diagnostic-1 (NDO-LID) (Leturiondo et al., 2019). These antigens have showed good diagnostic efficacy for MB leprosy cases; however, patients with PB leprosy have been less identified in the exams and considered as false-negatives (Barbieri et al., 2019). Regarding the biological sample used, blood has been collected to obtain serum; however, this procedure requires the presence of trained professionals to perform the sample collection, besides laboratorial structure to process the material. In addition, the procedure can cause local pain and is uncomfortable for the most of the patients (Eamudomkarn et al., 2018; Albuquerque et al., 2023). In this context, the use of less invasive biological samples, such as urine, could contribute to solve such problems, and this liquid has been used for the diagnosis of other pathologies (Gong et al., 2017; Raut et al., 2016; Eyayu et al., 2022; Oelemann et al., 2022). In the present study, we evaluated a recombinant chimeric protein, which was recently showed to be antigenic for the diagnosis of leprosy by using patient serum; in urine-based ELISA experiments for the diagnosis of both PB and MB conditions. Our purpose was to compare the diagnostic efficacy attributed to the M1 antigen against this biological analyte, and results showed satisfactory values of sensitivity and specificity; suggesting then that urine could be also considered as an alternative analyte for the diagnosis of leprosy, mainly in remote areas with restricted access to health care and/or with poor laboratorial structure.

Studies have showed the possibility to use urine for the diagnosis of leprosy. Parkash et al. (2004) searched for the gene codifying a *M. leprae* 36 kDa protein in

patient urine through a PCR technique. The authors evaluated 16 samples from leprosy patients and eight samples from healthy subjects and found a positivity of 40% for the diagnosis of disease. They concluded their study suggesting that urine-based PCR could be considered useful for the diagnose of leprosy. Caleffi et al. (2012) developed a PCR assay to amplify a *M. leprae* 151-bp fragment using patient urine. Seventy-three samples from leprosy patients and 50 samples from healthy subjects were evaluated, and results showed a positivity of 75 % for the diagnosis of leprosy, suggesting then that the method could be considered as alternative to leprosy diagnose using patient urine. Mayboroda et al. (2016) evaluated if urinary metabolites derived from *M. leprae* could be identified and correlated with the occurrence of disease. They evaluated longitudinally urine-derived profiles, and found urinary metabolome in patients, but not in endemic controls, suggesting that urine could be used with such diagnostic purpose. In addition, the authors described that these metabolic signatures present in the patient urine were different from those found in urine from healthy subjects; suggesting then their role as prognostic markers to detect the active disease.

Using urine-based ELISA to diagnose leprosy, only two studies were identified. Kaldany et al. developed an inhibition ELISA technique to detect the presence of phenolic glycolipid (PGL-1) in the urine from leprosy patients. The protein was identified in the most of patients tested, and the authors suggested that this analyte could be then considered as a simpler and sensitive liquid for the diagnosis of leprosy. Patil et al. developed an ELISA test to detect *M. leprae* antigens in urine from leprosy patients, and found the presence of specific antibodies in the patient urine with 85 % positivity. The authors concluded their study suggesting that the high positivity for the detection of *M. leprae* antigens in leprosy patient's urine could account for a precise diagnosis of the disease.

Other diagnostic tools have been also improved for the diagnosis of leprosy. Pathak et al. developed a well-done multiplex PCR assay employing three different gene targets, namely RLEP, 16SrRNA and sodA specific to target *M. leprae* DNA, and used slit skin scrapings, blood, nasal swab and saliva as biological samples collected from PB and MB leprosy patients, as well as from their PB household contacts; aiming to diagnose the disease. The authors found high diagnostic positivity for *M. leprae* DNA detection by the technique developed, when compared to data obtained using an individual PCR assay. They indicated a remarkable increase in the detection of the PB

cases; suggesting then the utility of multiplex PCR assay as an innovative strategy to be used for an early diagnosis of the leprosy. In this context, such studies have improved the quality of detection of infected patients, opening future possibilities to diagnose so early the disease and allow to a rapid and effective treatment.

Overall, MB leprosy is characterized by high bacillary loads in skin lesions followed by strong humoral reactivity and specific antibody production, while PB cases are related to low number of well-bordered skin lesions with low bacillary load, followed by the presence of less specific antibodies, making these patients more difficult to be detected in the serological analyses, and they are usually classified as false-negatives in the trials (Marçal *et al.*, 2018; Maeda *et al.*, 2007). As important as diagnosing and treating patients with the active disease; the investigation of their household contacts, when those are infected and can be incubating the disease, is also important (Nicchio *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017). In this context, the analysis of cellular and humoral response of family contacts from PB and, mainly, MB leprosy patients, could contribute to a better understanding of the disease manifestations, which could help for a precise diagnosis followed by a faster treatment (Gama *et al.*, 2019; Lopes-Luz *et al.*, 2023).

In the present study, we evaluated paired serum and urine samples from household contacts in both leprosy cases, by using M1 protein as antigen. For PB contacts cases, low levels of anti-M1 antibodies were found in both patient urine and serum samples, suggesting that the antigen was effective in discriminate between PB patients and their non-infected contacts. However, when experiments were performed with serum and urine samples from MB contacts, results revealed some of these subjects as presenting OD values above of the cut-off, being they classified as false-positives in the analysis. However, this fact can also suggest that these individuals are infected, but they did not present the active disease. The findings described here should be corroborated with additional evaluations and/or by follow-up of these individuals for longer period of time, aiming to evaluate if they will or not develop the active disease.

Limitations of the study include the lack of antibody follow-up in household contacts, mainly to the subjects that presented high levels of anti-M1 antibodies in ELISA experiments, when both patient urine and serum samples were used; as well as the absence of antibody follow-up in patients before and after their treatment, with the purpose to evaluate if the antigen could present a prognostic role for the disease. In addition, regarding the low OD values found in the experiments using urine and

serum samples from PB and MB leprosy patients; actually, we observed that the other patient and control groups should very low levels of cross-reactive antibodies in the experiments, in detrimental to the values obtained using leprosy patients' samples, which could suggest to a diagnosis of leprosy in our PB and MB patients. The occurrence of low, but distinct, OD values between patient and control groups have been described in diagnostic studies for other infectious diseases (Camara et al., 2024; Assis *et al.*, 2024); which could suggest that low, but distinct, levels of specific antibodies are promising to indicate the detection of the disease in such patients. However, the use of other diagnostic tools could help to increase such difference in the detection of specific antibodies, but, for our purpose, the own humoral distinction between the patient and control classes suggest the effectivity, although preliminary, of our diagnostic antigen in the ELISA platforms developed. Additionally, additional studies using other comparative and known diagnostic antigens for the diagnosis of leprosy, such as NDO-HAS, LID-1, NDO-LID, among others; are required to be developed to verify the current diagnostic efficacy of M1 protein for leprosy. In this context, data described here as preliminary and could be considered as a proof-of-concept of the use of M1 for the diagnosis of PB and MB leprosy.

CRedit authorship contribution statement

Raquel S.B. Camara: Methodology, Investigation. Isabela A.G. Pereira: Methodology, Investigation. Geise C. Espíndola: Validation, Supervision, Project administration, Investigation, Conceptualization. Daniela P. Lage: Methodology, Investigation. Ana L. Silva: Methodology, Investigation. Camila S. Freitas: Methodology, Investigation. Bárbara P.N. Assis: Validation, Investigation, Conceptualization. Laís V.A. Corrêa: Methodology, Formal analysis, Data curation. Ricardo L. F. Moreira: Investigation, Data curation, Conceptualization. Sandra Lyon: Investigation, Data curation, Conceptualization. Rozana C. Silva: Methodology, Data curation, Conceptualization. Tiago S. Barros: Validation, Methodology. Ana Laura G. de Oliveira: Methodology, Investigation, Conceptualization. Fernanda Ludolf: Methodology, Formal analysis. Miguel A. Chávez-Fumagalli: Writing – original draft, Software, Data curation. Myron Christodoulides: Writing – original draft, Resources, Project administration, Conceptualization. Ricardo A.

Machado-de-Ávila: Writing – original draft, Methodology, Conceptualization. Unai Tupinambás: Supervision, Investigation, Formal analysis, Data curation. Denise

U. Gonçalves: Formal analysis, Data curation, Conceptualization. Manoel O. da Costa Rocha: Writing – original draft, Visualization, Project administration, Methodology, Conceptualization. Eduardo A.F. Coelho: Writing – original draft, Supervision, Resources, Formal analysis, Conceptualization. Ana T. Chaves: Writing – original draft, Validation, Supervision, Conceptualization.

Declaration of interest statement

The authors declare that no commercial or financial conflict of interest exist.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Hospital Eduardo de Menezes, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. This work was supported by grants APQ-02167-21 and RED-0067-23 (Rede Mineira de Imunobiológicos) from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), as well the grant 402417/2023-2 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors also thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), FAPEMIG and CNPq for the scholarships.

References

- Aamir M, Sadaf A, Khan S, Perveen S, Khan A. Recent Advancement in the Diagnosis and Treatment of Leprosy. *Curr Top Med Chem*. 2018;18(18):1550-1558.
- Albuquerque LWN, Ferreira SCA, Thomaz Dos Santos Varjão M, da Silva AE, Duarte AWF, Silva GT, Alexandre-Moreira MS, de Queiroz AC. [New immunodiagnostic methods for human tegumentary leishmaniasis in the last 10 years: Technological prospecting](#). *Acta Trop*. 2023 Jun;242:106903
- Andama A, Whitman GR, Crowder R, Reza TF, Jaganath D, Mulondo J, Nalugwa TK, Semitala FC, Worodria W, Cook C, Wood RC, Weigel KM, Olson AM, Lohmiller Shaw J, Kato-Maeda M, Denkinger CM, Nahid P, Cangelosi GA, Cattamanchi A. Accuracy of Tongue Swab Testing Using Xpert MTB-RIF Ultra for Tuberculosis Diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2022 Jul 20;60(7):e0042122.
- Assis BPN, Chaves AT, Lage DP, Cardoso MM, Pereira IAG, Câmara RSB, Freitas CS, Martins VT, Ludolf F, de Oliveira ALG, Oliveira-da-Silva JA, Tavares GSV, Galdino AS, Chávez-Fumagalli MA, Machado-de-Ávila RA, Christodoulides M, Gonçalves DU, Bueno LL, Fujiwara RT, Coelho EAF, da Costa Rocha MO. [A recombinant chimeric antigen constructed with B-cell epitopes from](#)

- [Mycobacterium leprae hypothetical proteins is effective for the diagnosis of leprosy.](#) *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2024 Jul;109(3):116338.
- Barbieri RR, Manta FSN, Moreira SJM, Sales AM, Nery JAC, Nascimento LPR, Hacker MA, Pacheco AG, Machado AM, Sarno EM, Moraes MO. [Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study.](#) *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Mar 5;13(3):e0007147.
- Chen KH, Lin CY, Su SB, Chen KT. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. *J Trop Med.* 2022 Jul 4;2022:8652062.
- Caleffi KR, Hirata RD, Hirata MH, Caleffi ER, Siqueira VL, Cardoso RF. [Use of the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium leprae in urine.](#) *Braz J Med Biol Res.* 2012 Feb;45(2):153-7.
- Câmara RSB, Pereira IAG, Lage DP, Vale DL, Ludolf F, Galvani NC, Freitas CS, Oliveira-da-Silva JA, Assis BPN, Chaves AT, Giusta MS, Tavares GSV, Pereira CN, Galdino AS, Tupinambás U, Chávez-Fumagalli MA, Pascoal VPM, Eller MTC, da Costa Rocha MO, Christodoulides M, Machado-de-Ávila RA, Gonçalves DU, Coelho EAF. Comparison of urine and serum IgG detection ELISA for tegumentary leishmaniasis diagnosis and prognosis. *Immunobiology.* 2024a Sep 17;229(6):152853.
- Câmara RSB, Pereira IAG, Lage DP, Vale DL, Ludolf F, Cardoso MM, Freitas CS, Oliveira-da-Silva JA, Assis BPN, Chaves AT, Pimenta BL, Silva MGP, Tavares GSV, Galdino AS, Tupinambás U, Chávez-Fumagalli MA, Pascoal VPM, Eller MTC, Rocha MODC, Machado-de-Ávila RA, Gonçalves DU, Coelho EAF. [Non-invasive urine-based ELISA using a recombinant Leishmania protein to diagnose tegumentary leishmaniasis.](#) *Acta Trop.* 2024b Oct;258:107326.
- Carvalho AP, da Conceição Oliveira Coelho Fabri A, Corrêa Oliveira R, Lana FC. Factors associated with anti-phenolic glycolipid-I seropositivity among the household contacts of leprosy cases. *BMC Infect Dis.* 2015 May 30;15:219.
- Carvalho APM, Coelho ADCO, Correa-Oliveira R, Lana FCF. Specific antigen serologic tests in leprosy: implications for epidemiological surveillance of leprosy cases and household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017 Sep;112(9):609-616.
- Chen KH, Lin CY, Su SB, Chen KT. Leprosy: A Review of Epidemiology, Clinical Diagnosis, and Management. *J Trop Med.* 2022 Jul 4;2022:8652062.
- Eamudomkarn C, Sithithaworn P, Kamamia C, Yakovleva A, Sithithaworn J, Kaewkes S, Techasen A, Loilome W, Yongvanit P, Wangboon C, Saichua P, Itoh M, M Bethony J. [Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis.](#) *PLoS One.* 2018 Jul 9;13(7):e0192598.
- Eyayu T, Yasin M, Workineh L, Tiruneh T, Andualem H, Sema M, Damtie S, Abebaw A, Getie B, Andargie D, Achaw B, Taklual W. Evaluation of urine sample for diagnosis of visceral leishmaniasis using rK-39 immunochromatographic test in Northwest Ethiopia. *PLoS One.* 2022 Feb 7;17(2):e0263696.
- Gama RS, Souza MLM, Sarno EN, Moraes MO, Gonçalves A, Stefani MMA, Garcia RMG, Fraga LAO. A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Jun 10;13(6):e0007400.
- Ghosh P, Bhaskar KR, Hossain F, Khan MA, Vallur AC, Duthie MS, Hamano S, Salam MA, Huda MM, Khan MG, Coler RN, Reed SG, Mondal D. Evaluation of diagnostic performance of rK28 ELISA using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis.

- Parasit Vectors. 2016 Jul 4;9(1):383.
- Gong Y, Li Q, Yuan Y. Accuracy of testing for anti-Helicobacter pylori IgG in urine for H. pylori infection diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open*. 2017 Apr 28;7(4):e013248.
- Han XY, Sizer KC, Velarde-Félix JS, Frias-Castro LO, Vargas-Ocampo F. [The leprosy agents Mycobacterium lepromatosis and Mycobacterium leprae in Mexico](#). *Int J Dermatol*. 2012 Aug;51(8):952-9.
- Jian L, Xiujian S, Yuangang Y, Yan X, Lianchao Y, Duthie MS, Yan W. [Evaluation of antibody detection against the NDO-BSA, LID-1 and NDO-LID antigens as confirmatory tests to support the diagnosis of leprosy in Yunnan province, southwest China](#). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2020.
- Kaldany RR, Maasho K, Ohman R, Reitz-Vick D, Britton S, Lefford MJ. Methods for the detection of a specific Mycobacterium leprae antigen in the urine of leprosy patients. *Scand J Immunol*. 1987 Jan;25(1):37-43.
- Lei JH, Guan F, Xu H, Chen L, Su BT, Zhou Y, Wang T, Li YL, Liu WQ. Application of an immunomagnetic bead ELISA based on IgY for detection of circulating antigen in urine of mice infected with Schistosoma japonicum. *Vet Parasitol*. 2012 Jun 8;187(1-2):196-202.
- Leturiondo AL, Noronha AB, do Nascimento MOO, Ferreira CO, Rodrigues FDC, Moraes MO, Talhari C. [Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil](#). *BMC Infect Dis*. 2019 Jan 7;19(1):22.
- Lopes-Luz L, Saavedra DP, Fogaça MBT, Bühner-Sékula S, Stefani MMA. [Challenges and advances in serological and molecular tests to aid leprosy diagnosis](#). *Exp Biol Med (Maywood)*. 2023 Nov;248(22):2083-2094.
- Marçal PHF, Fraga LAO, Mattos AMM, Menegati L, Coelho ADCO, Pinheiro RO, Sarno EN, Duthie MS, Teixeira HC. [Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy](#). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018;113(5):e170467.
- Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Apr 10;8(4):e2655.
- Mayboroda OA, van Hooij A, Derks R, van den Eeden SJ, Dijkman K, Khadge S, Thapa P, Kunwar CB, Hagge DA, Geluk A. Exploratory urinary metabolomics of type 1 leprosy reactions. *Int J Infect Dis*. 2016 Apr;45:46-52.
- Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, Dacso MM, Rao PN, Stryjewska BM, Hugh J, Dellavalle RP, Dunnick CA. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. *J Am Acad Dermatol*. 2020 Jul;83(1):1-14.
- Meng Y, Lou H, Wang Y, Wang C, Zhang L. The use of specific immunoglobulin E in nasal secretions for the diagnosis of allergic rhinitis. *Laryngoscope*. 2018 Sep;128(9):E311-E315.
- Mungroo MR, Khan NA, Siddiqui R. Mycobacterium leprae: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. *Microb Pathog*. 2020 Dec;149:104475.
- Nicchio MV, Araujo S, Martins LC, Pinheiro AV, Pereira DC, Borges A, Antunes DE, Barreto JG, Goulart IM. Spatial and temporal epidemiology of Mycobacterium leprae infection among leprosy patients and household contacts of an endemic region in Southeast Brazil. *Acta Trop*. 2016 Nov;163:38-45.
- Oelemann WM, Lowndes CM, Veríssimo Da Costa GC, Morgado MG, Castello-Branco LR, Grinsztejn B, Alary M, Bastos FI. Diagnostic detection of human immunodeficiency virus type 1 antibodies in urine: a brazilian study. *J Clin*

- Microbiol. 2002 Mar;40(3):881-5.
- Parkash O, Singh HB, Rai S, Pandey A, Katoch VM, Girdhar BK. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2004 Sep-Oct;46(5):275-7.
- Patil SA, Katoch K, Sengupta U. A method for the detection of *M. leprae* antigens in urine of leprosy patients by gel diffusion and gel electrophoretic techniques and significance in diagnosis. Acta Leprol. 1991;7(5):403-7.
- Raut CG, Hanumaiah H, Raut WC. Utilization and Assessment of Throat Swab and Urine Specimens for Diagnosis of Chikungunya Virus Infection. Methods Mol Biol. 2016;1426:75-83.
- Samad MS, Itoh M, Moji K, Hossain M, Mondal D, Alam MS, Kimura E. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection using urine samples and its application in Bangladesh. Parasitol Int. 2013 Dec;62(6):564-7.
- Scussel R, Feuser PE, Luiz GP, Galvani NC, Fagundes MÍ, Gonçalves Dal-Bó A, Hermes de Araújo PH, Coelho EAF, Chávez-Olórtegui C, Machado-de-Ávila RA. [Peptide-Integrated Superparamagnetic Nanoparticles for the Identification of Epitopes from SARS-CoV-2 Spike and Nucleocapsid Proteins.](#) ACS Appl Nano Mater. 2022 Jan 28;5(1):642-653.
- Sereno D, Akhoundi M, Sayehmri K, Mirzaei A, Holzmuller P, Lejon V, Waleckx E. Noninvasive Biological Samples to Detect and Diagnose Infections due to Trypanosomatidae Parasites: A Systematic Review and Meta-Analysis. Int J Mol Sci. 2020 Feb 29;21(5):1684.
- Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, Suzuki K. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. Virulence. 2022 Dec;13(1):1985-2011.
- World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2022: new paradigm - control to elimination. Weekly Epidemiological Report, v. 98, n. 37, p. 409-30, 2023.
- Zhang CZ, Cheng XQ, Li JY, Zhang P, Yi P, Xu X, Zhou XD. Saliva in the diagnosis of diseases. Int J Oral Sci. 2016 Sep 29;8(3):133-7.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo apontou avanços na busca por métodos diagnósticos eficientes e menos invasivos para a hanseníase. Assim, a imunodeteção de anticorpos específicos para a doença, realizada por meio do uso da proteína M1, mostrou-se eficaz com o uso da urina, destacando seu potencial como abordagem diagnóstica inovadora. O uso dos peptídeos sintéticos, contra um painel menor de amostras de soro e urina, possibilitou verificar a viabilidade da quimera M1. Após avaliação dos resultados preliminares foi possível considerar a viabilidade do uso da quimera no diagnóstico da doença por meio dos ensaios de ELISA.

No soro, valores de sensibilidade e especificidade para diferenciar os pacientes com hanseníase dos indivíduos saudáveis e pacientes com doenças de reação cruzada foram de 100%. A sensibilidade e especificidade para diferenciar pacientes com hanseníase de seus contatos foi de 94,2% e 100%, respectivamente. Os valores de VPP e VPN para diferenciar pacientes com hanseníase de indivíduos saudáveis e pacientes com outras doenças foram de 100%, enquanto aqueles calculados para diferenciar pacientes com hanseníase de seus contatos foram de 100% e 93,3%, respectivamente. Na urina, os valores de sensibilidade e especificidade para diferenciar pacientes com hanseníase de indivíduos saudáveis e pacientes com outras infecciosas foram de 100%.

Na urina, os valores de sensibilidade e especificidade utilizados para diferenciar pacientes com hanseníase de seus contatos foram de 97,0% e 100%, respectivamente. Os valores de VPP e VPN para diferenciar pacientes com hanseníase de indivíduos saudáveis e pacientes com outras doenças infecciosas foram ambos de 100%, enquanto aqueles calculados para diferenciar pacientes com hanseníase de seus contatos foram de 100% e 96,7%, respectivamente.

O estudo apresenta limitações, como o baixo número de amostras utilizado, a ausência de acompanhamento dos contatos domiciliares para verificar se os mesmos desenvolveriam ou não a doença, uma vez que os mesmos podem apresentar baixos níveis de anticorpos anti-M1 e eventualmente desenvolver a doença. Inclui-se também como limitação a ausência de ensaios usando amostras de urina e soro coletadas antes e após o tratamento para avaliar seguimento dos indivíduos.. Neste contexto, os dados apresentados devem ser considerados

preliminares e uma prova-de-conceito do potencial uso do antígeno M1 para diagnosticar a hanseníase usando urina e soro dos pacientes.

7 CONCLUSÃO

A análise da urina como amostra biológica revelou resultados promissores, posicionando-a como uma alternativa viável e prática em comparação à coleta convencional de soro. A elevada sensibilidade e especificidade observadas nesses resultados preliminares indicam que este método pode ser útil para diagnóstico em áreas endêmicas com pouca disponibilidade de exames convencionais e na avaliação e monitoramento de contatos, especialmente, multibacilares. Diante do exposto, faz-se necessário novos estudos e experimentos que possam replicar e expandir os experimentos realizados e consolidar os achados encontrados.

PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, propõe-se:

- Testar maior número de casos PB e MB e contatos das diferentes formas clínicas, além de incluir pacientes provenientes de outras regiões geográficas.
- Ampliar a testagem de pacientes com outras doenças infecciosas, em especial com tuberculose e outras micobacterioses.
- Utilizar a quimera M1 no acompanhamento longitudinal dos contatos intradomiciliares de hanseníase para verificar se contactantes positivos apresentam maior risco de adoecer do que os soronegativos mantendo análise na urina.
- Incluir estudos de pacientes com alteração renal comparado com pacientes sem quaisquer alterações renais e urinárias para verificar possíveis diferenças ou não.
- Incorporar a quimera M1 em fitas de diagnóstico rápido e fazer a testagem em áreas endêmicas desprovidas de maiores recursos financeiros e de Saúde Pública.

REFERÊNCIAS

ALECRIN, E.S.; MARTINS, M.A.P.; OLIVEIRA, A.L.G.; LYON, S.; LAGES, A.T.C.; REIS, I.A.; PEREIRA, F.H.; OLIVEIRA, D.; GOULART, I.M.B.; ROCHA, M.O. Models for predicting the risk of illness in leprosy contacts in Brazil: Leprosy prediction models in Brazilian contacts. **Tropical Medicine & International Health**, v. 29, n. 8, p. 680-696, ago. 2024. DOI: 10.1111/tmi.14020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tmi.14020>. Acesso em: 11 out. 2024.

ANNE, C.; MAHON, A.; NURLIGN, B.; KEBEDE, M.; BECX-BLEUMINK, Marijke; LEFFORD, M. J. Urinary phenolic glycolipid 1 in the diagnosis and management of leprosy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, n. 3, p. 653, 1991. DOI: 10.1093/INFDIS/163.3.653. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/163/3/653/827945>. Acesso em: 11 out. 2024.

ANTUNES, S. L. et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 2, p. 246-253, mar. 2012. Erratum in: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 4, p. 570, jun. 2012. DOI: 10.1590/s0074-02762012000200015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/vLyGMm7Z7YfCGpJY6M7pxNw/?lang=en>. Acesso em: 11 out. 2024.

ARTHANINGSIH, D. A. A. D.; MARGHA, N. P. T. M. Literature review: accuracy of diagnostic tests for leprosy. **Opsearch**, v. 2, p. 682–695, 2023. DOI: 10.58811/opsearch.v2i9.75.

ASFARAM, S. et al. Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis - **PubMed. Parasitology international**, v. 67, n. 5, 1 out. 2018.

ASSIS, B. P. N. et al. A recombinant chimeric antigen constructed with B-cell epitopes from *Mycobacterium leprae* hypothetical proteins is effective for the diagnosis of leprosy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 109, n. 3, p. 116338, jul. 2024. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116338. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38718661/>. Acesso em: 18 set. 2024.

ATES, H. C. et al. Integrated Devices for Non-Invasive Diagnostics. **Advanced Functional Materials**, p. 2010388, 4 jan. 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/adfm.202010388>. Acesso em: 18 out. 2024.

BANERJEE, S. et al. Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 12, p. 1522-1527, dez. 2011. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2011.04994.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-4632.2011.04994.x>. Acesso em: 11 out. 2024.

BEYENE, D.; ASEFFA, A.; HARBOE, M. et al. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. **Epidemiol Infect**, V. 131, N. 2, p. 841-848, 2003. DOI:10.1017/s0950268803001079.

BIENENSTOCK, J.; TOMASI, T. B. Jr. Secretory gamma-A in normal urine. **J Clin Invest**, v. 47, n. 5, p. 1162-71, May 1968.

BOCHUD, P. Y. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, p. 253-261, 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/197/2/253/812087>. Acesso em: 12 out. 2024.

BOYCE, W. H.; GARVEY, F. K.; NORFLEET, C. M. Jr. Proteins and other biocolloids of urine in health and in calculous disease. I. Electrophoretic studies at pH 4.5 and 8.6 of those components soluble in molar sodium chloride. **J Clin Invest**, v. 33, n. 10, p. 1287-97, Oct 1954.

BRASIL. **Leprosy Epidemiological Record 2024**. Brasília: Ministério da Saúde. ISSN 9352-7864.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 54 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniose.pdf. Acesso em: 12 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de prevenção de incapacidades**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 140 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_prevencao_incapacidades.pdf. Acesso em: 11 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico Hanseníase 2023**. Brasil: Ministério da Saúde, jan. 2023. 56 p. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-contenido/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hanseniose-2023_internet_completo.pdf/view.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas da hanseníase**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. 152 p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hanseniose/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-da-hanseniose-2022/view>. Acesso em: 11 out. 2024.

BRENNAN, P. J.; BARROW, W. W. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. **International Journal of Leprosy Other Mycobacterial Diseases**, v. 48, n. 4, p. 382-387, 1980. PMID: 7009448.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. **Leprosy**. *Lancet*, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 2004. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15952-7. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/328/7454/1447.short>. Acesso em: 05 out. 2024.

CABRAL, N. et al. Modulation of the Response to *Mycobacterium leprae* and Pathogenesis of Leprosy. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 918009, 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.918009. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.918009/full>. Acesso em: 12 out. 2024.

CALEFFI, K. R.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; CALEFFI, E. R.; SIQUEIRA, V. L.

D.; CARDOSO, R. F. Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium leprae* in urine. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 153-157, 2012. DOI: 10.1590/S0100-879X2012007500011.

CÂMARA, R. S. B. et al. Comparison of urine and serum IgG detection ELISA for tegumentary leishmaniasis diagnosis and prognosis. **Immunobiology**, v. 229, n. 6, p. 152853, 17 set. 2024.

CÂMARA, R. S. B. et al. Non-invasive urine-based ELISA using a recombinant *Leishmania* protein to diagnose tegumentary leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 258, p. 107326, out. 2024.

CANUTO, M. J. M.; YACOUB, C. R. D.; TRINDADE, M. A. B.; AVANCINI, J.; PAGLIARI, C.; SOTTO, M. N. Histoid leprosy: clinical and histopathological analysis of patients in follow-up in University Clinical Hospital of endemic country. **International Journal of Dermatology**, v. 57, p. 707-712, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijd.13926>. Acesso em: 04 out. 2024.

CHUNGKANCHANA, N. et al. Concentration of Urine Samples Improves Sensitivity in Detection of Strongyloides-Specific IgG Antibody in Urine for Diagnosis of Strongyloidiasis. **J Clin Microbiol**, v. 60, n. 1, p. e0145421, Jan 19, 2022.

COLLIN, SIMON M. et al. Systematic review of Hansen disease attributed to *Mycobacterium lepromatosis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 1376, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10310392/>. Acesso em: 14 out. 2024.

DAVID, D.; DAS, M.; MANI CHANDRA, H. A comparative study on the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in urine samples of leprosy patients using Rlep-PCR with other conventional samples. **Molecular Biology Reports**, v. 51, n. 1, p. 504, 2024. DOI: 10.1007/s11033-024-09470-0.

DECRAMER, S. et al. Urine in Clinical Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1850-1862, 30 jul. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.r800001-mcp200>. Acesso em: 10 out. 2024.

DEPS, Patrícia; COLLIN, Simon M. *Mycobacterium lepromatosis* as a Second Agent of Hansen's Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 10 set. 2021a. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698588>. Acesso em: 11 out. 2024.

DEPS, P. D.; FLORIAN, M. C.; VIRMOND, M. C. L. **Hanseníase na prática clínica**. São Paulo: Editora dos Editores Eireli, 2022.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, p. 897-900, 2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/cdli.11.5.897-900.2004>. Acesso em: 05 out. 2024.

DUTHIE, M. S.; GOTO, W.; IRETON, G. C. et al. Use of proteins antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v.14, n.11, p.1400-8, Nov.

2007. DOI:10.1128/CVI.00299-07. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17898185>

DUTHIE, M. S.; HAY, M. N.; MORALES, C. Z. et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n.2, p. 298-303, Feb. 2010. DOI:10.1128/CVI.00400-09. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2815528>.

DUTHIE, M. S.; RAYCHAUDHURI, R.; TUTTERROW, Y. L. 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. 233-239, 2014a. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24666703>.

DWIVEDI, P.; SHARMA, M.; ANSARI, A.; SINGH, P. Genetic diversity of Mycobacterium leprae: need to move towards genome-wide approaches. **Indian Journal of Medical Research**, v. 159, n. 2, p. 121-129, Feb. 2024. doi: 10.4103/ijmr.ijmr_2383_22. Disponível em: https://journals.lww.com/ijmr/fulltext/2024/02000/genetic_diversity_of_mycobacterium_leprae__need_to.2.aspx?context=latestarticles. Acesso em: 09 out. 2024.

EAMUDOMKARN, C. et al. Diagnostic performance of urinary IgG antibody detection: A novel approach for population screening of strongyloidiasis. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. e0192598, 2018.

ELHAG, S. M. et al. Detection of schistosomiasis antibodies in urine patients as a promising diagnostic maker. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 10, p. 773–777, 2011.

ELSANA, S. et al. HCV antibodies in saliva and urine. **Journal of Medical Virology**, v. 55, n. 1, p. 24–27, 1998.

FROES JUNIOR, L. A. R.; SOTTO, M. N.; TRINDADE, M. A. B. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, p. 338-347, 2022. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/XSq7F7hNMMyvWB4PMYJDyjn/>. Acesso em: 05 out. 2024.

GONÇALVES, M.; BUENO, L. L.; FUJIWARA, R. T.; COELHO, E. A. F.; DA COSTA ROCHA, M. O. A recombinant chimeric antigen constructed with B-cell epitopes from Mycobacterium leprae hypothetical proteins is effective for the diagnosis of leprosy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 109, n. 3, p. 116338, Jul. 2024. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116338. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889324001676>. Acesso em: 05 out. 2024.

GOULART, I. M.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao Mycobacterium leprae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002. DOI: 10.1590/s0037-86822002000400014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/YpsJ3XmYgL7K5vjRhDw35bq/>. Acesso em: 05 out.

2024.

GOULART, L. R.; GOULART, I. M. Leprosy pathogenetic background: a review and lessons from other mycobacterial diseases. **Archives of Dermatological Research**, v. 301, n. 2, p. 123-137, 2009. DOI: 10.1007/s00403-008-0917-3. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-008-0917-3>. Acesso em: 08 out. 2024.

GURUNG, P.; GOMES, C. M.; VERNAL, S.; LEEFLANG, M. M. G. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 11, p. 1315-1327, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X19302836>. Acesso em: 05 out. 2024.

HANSON, L.; TAN, E. Characterization of antibodies in human urine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 44, p. 703–715, 1965.

HUANG, C. Y.; SU, S. B.; CHEN, K. T. An update of the diagnosis, treatment, and prevention of leprosy: a narrative review. **Medicine (Baltimore)**, v. 103, n. 34, p. e39006, Aug. 2024. doi: 10.1097/MD.00000000000039006. Disponível em: https://journals.lww.com/md-journal/fulltext/2024/08230/an_update_of_the_diagnosis,_treatment,_and.21.aspx. Acesso em: 11 out. 2024.

ITOH, M. et al. Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Wuchereria bancrofti* infection in urine samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 362-365, 2001.

ITOH, M. et al. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples: a tool for surveillance of schistosomiasis japonica. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 34, n. 3, p. 469–472, 2003.

KALDANY, R. R.; MAASHO, K.; OHMAN, R.; REITZ-VICK, D.; BRITTON, S.; LEFFORD, M. J. Methods for the detection of a specific *Mycobacterium leprae* antigen in the urine of leprosy patients. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 37-43, 1987. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1987.tb01044.x.

KAUFMAN, D. B.; KATZ, R.; McINTOSH, R. M. Secretory IgA in urinary tract infections. **British Medical Journal**, v. 4, n. 5733, p. 463-465, 1970.

KHADILKAR, Satish V.; PATIL, Sarika B.; SHETTY, Vanaja P. Neuropathies of leprosy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 420, p. 117288, jan. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.117288>. Acesso em: 19 Out. 2024.

MACEDO, C. S. et al. New insights into the pathogenesis of leprosy: contribution of subversion of host cell metabolism to bacterial persistence, disease progression, and transmission. **F1000Research**, v. 9, p. F1000 Faculty Rev-70, 2020. DOI: 10.12688/f1000research.21383.1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6996526/>. Acesso em: 05 out. 2024.

MANTA, F. S. N.; JACOMASSO, T.; RAMPAZZO, R. C. P. et al. Development and validation of a multiplex real-time qPCR assay using GMP-grade reagents for leprosy

diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p. e0009850, Feb. 2022. doi: 10.1371/journal.pntd.0009850. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0009850>. Acesso em: 11 out. 2024.

MARQUES, M. A. et al. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 2942-2953, out. 2004. DOI: 10.1002/pmic.200400945. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15378742/>. Acesso em: 16 out. 2024.

MARQUES, M. A. et al. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2477-2491, jun. 2008. DOI: 10.1002/pmic.200700971. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18563741/>. Acesso em: 18 out. 2024.

MARRI, P. R.; BANNANTINE, J. P.; GOLDING, G. B. Comparative genomics of metabolic pathways in *Mycobacterium* species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, n. 6, p. 906-925, Nov. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00041.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/30/6/906/494109>. Acesso em: 12 out. 2024.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Leprosy-related mortality in Brazil: a neglected condition of a neglected disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 109, n. 10, p. 643-652, 2015. DOI: 10.1093/trstmh/trv069. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/109/10/643/2461519>. Acesso em: 11 out. 2024.

MARTINEZ, A. N.; TALHARI, C.; MORAES, M. O. et al. PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, e.2655, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002655>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002655>. Acesso em: 22 out. 2024.

MCGARRY, E.; SEHON, A. H.; ROSE, B. The isolation and electrophoretic characterization of the proteins in the urine of normal subjects. **Journal of Clinical Investigation**, v. 34, n. 6, p. 832-844, 1955.

MCKENZIE, H.; YOUNG, D. N. Antibody to coliform antigens in urine samples from patients with symptoms of urinary tract infection. **Journal of Clinical Pathology**, v. 40, n. 7, p. 787-792, 1987. Disponível em: [invalid URL removed]. Acesso em: 18 nov. 2024.

MCLENON, J.; ROGERS, M. A. M. The Fear of Needles: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Advanced Nursing**, 2018.

LIMA, F. R.; PAULA, N. A.; SIMOES, M. M. R. et al. Bacilloscopy and polymerase chain reaction of slit-skin smears and anti-phenolic glycolipid serology for Hansen's disease diagnosis. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**, v. 9, p. 972244, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2022.972244/full>. Acesso em: 15 out. 2024.

LOPES, J. G. C. B. S. et al. Subdiagnóstico de hanseníase no Brasil durante a

pandemia da covid-19. **Revista Eletrônica Acervo Médico**, v. 20, p. e11172, 2022. Disponível em: <https://acervomais.com.br/index.php/medico/article/view/11172>. Acesso em: 11 out. 2024.

LOPES-LUZ, L.; SAAVEDRA, D. P.; FOGAÇA, M. B. T.; BÜHRER-SÉKULA, S.; STEFANI, M. M. A. Challenges and advances in serological and molecular tests to aid leprosy diagnosis. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood), v. 248, n. 22, p. 2083-2094, nov. 2023. DOI: 10.1177/15353702231209422. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38059475/>. Acesso em: 18 out. 2024.

LUDOLF, Fernanda; RAMOS, Fernanda F.; COELHO, Eduardo A. F. Immunoproteomics and phage display in the context of leishmaniasis complexity. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 8 fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1112894>. Acesso em: 18 out. 2024.

LUDOLF, F. et al. Detecting anti-SARS-CoV-2 antibodies in urine samples: A noninvasive and sensitive way to assay COVID-19 immune conversion. **Science Advances**, v. 8, n. 19, p. eabn7424, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abn7424>.

LYON, S. et al. Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, 2008. Supl 2.

LUPPI, A. M.; FERREIRA, G. E.; PRUDENCIO, D. L.; ANTUNES, D. E.; ARAÚJO, L.; SANTOS, D. F.; BARBOSA, M. H. N.; GOULART, Isabela Maria Bernardes. High-resolution ultrasonography for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. **PLOS Medicine**, v. 1, p. 1-1, 2023. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0285450>. Acesso em: 11 out. 2024.

LYON, S. et al. Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, 2008. Supl 2.

MACEDO, C. S. et al. New insights into the pathogenesis of leprosy: contribution of subversion of host cell metabolism to bacterial persistence, disease progression, and transmission. **F1000Research**, v. 9, p. F1000 Faculty Rev-70, 2020. DOI: 10.12688/f1000research.21383.1. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6996526/>. Acesso em: 05 out. 2024.

MANTA, F. S. N.; JACOMASSO, T.; RAMPAZZO, R. C. P. et al. Development and validation of a multiplex real-time qPCR assay using GMP-grade reagents for leprosy diagnosis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 2, p. e0009850, Feb. 2022. doi: 10.1371/journal.pntd.0009850. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0009850>. Acesso em: 11 out. 2024.

MARQUES, M. A. et al. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 2942-2953, out. 2004. DOI: 10.1002/pmic.200400945. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15378742/>. Acesso em: 16 out. 2024.

MARQUES, M. A. et al. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell

envelope. **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2477-2491, jun. 2008. DOI: 10.1002/pmic.200700971. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18563741/>. Acesso em: 18 out. 2024.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Leprosy-related mortality in Brazil: a neglected condition of a neglected disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 10, p. 643-652, 2015. DOI: 10.1093/trstmh/trv069. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/109/10/643/2461519>. Acesso em: 11 out. 2024.

MENDONÇA, I. M. S. et al. Impacto da pandemia de covid-19 no atendimento ao paciente com hanseníase: estudo avaliativo sob a ótica do profissional de saúde. **Research, Society and Development**, v. 11, p. e4111225459, 2022. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25459>. Acesso em: 15 out. 2024.

MENESES, Gdayllon Cavalcante et al. Urinary monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in leprosy patients: increased risk for kidney damage. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, 20 ago. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-451>. Acesso em: 18 nov. 2024.

MUHAMMED, Y. The Best IgG Subclass for the Development of Therapeutic Monoclonal Antibody Drugs and their Commercial Production: A Review. **Immunome Research**, v. 16, n. 1, 2020.

NAGAOKA, F.; YAMAZAKI, T.; AKASHI-TAKAMURA, S.; ITOH, M. Detection of urinary antibodies and its application in epidemiological studies for parasitic diseases. **Vaccines (Basel)**, v. 9, n. 7, p. 778, Jul. 2021. doi: 10.3390/vaccines9070778. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/7/778>. Acesso em: 11 out. 2024.

OLCÉN, P.; HARBOE, M.; WARNDORFF, T.; BELEHU, A. Anti-Mycobacterium leprae antibodies in urine from lepromatous patients examined by crossed immunoelectrophoresis and radioimmunoassay. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1984. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1984.tb00963.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3083.1984.tb00963.x>. Acesso em: 11 out. 2024.

OLIVEIRA, A. L. G. de et al. Diagnostic accuracy of tests using recombinant protein antigens of Mycobacterium leprae for leprosy: A systematic review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 13, n. 8, p. 1078-1088, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.12.011>. Acesso em: 15 nov. 2024.

PARKASH, O.; SINGH, B. P. Advances in proteomics of Mycobacterium leprae. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, n. 4, p. 369-378, Apr. 2012. doi: 10.1111/j.1365-3083.2012.02677.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3083.2012.02677.x>. Acesso em: 15 out. 2024.

PARKASH, O.; SINGH, H. B.; RAI, S.; PANDEY, A.; KATOCH, V. M.; GIRDHAR, B. K. Detection of Mycobacterium leprae DNA for 36kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 275-277, 2004. DOI: 10.1590/S0036-46652004000500008.

PATIL, S.; DWIVEDI, P.; KIRAN, K.; SINGH, K.; SENGUPTA, U. Detecção de anticorpos para o determinante de 35 kD de *M. leprae* na urina e no soro de pacientes com hanseníase. **Acta Leprologica**, v. 7, n. 2, p. 139–143, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1699385>.

PENNA, Maria Lucia F. et al. Anti-PGL-1 Positivity as a Risk Marker for the Development of Leprosy among Contacts of Leprosy Cases: Systematic Review and Meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004703, 18 maio 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004703>. Acesso em: 18 nov. 2024.

PESSOLANI, M. C.; BRENNAN, P. J. Molecular definition and identification of new proteins of *Mycobacterium leprae*. **Infect Immun**, v. 64, n. 12, p. 5425-5427, 1996. DOI:10.1128/iai.64.12.5425-5427.1996. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.64.12.5425-5427.1996>. Acesso em: 20 abr. 2022.

PERRY, K. R. et al. The detection in urine specimens of IgG and IgM antibodies to hepatitis A and hepatitis B core antigens. **Journal of Medical Virology**, v. 38, n. 4, p. 265-270, dez. 1992.

RASHAD-RUDOLF, J. et al. Methods for the detection of a specific *Mycobacterium leprae* antigen in the urine of leprosy patients. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1986. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1987.tb01044.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3083.1987.tb01044.x>. Acesso em: 14 out. 2024.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. **International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases**, v. 34, n. 3, p. 255-273, Jul./Sep. 1966. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19672900821>. Acesso em: 14 out. 2024.

ROMERO, C. P.; CASTRO, R.; DO BRASIL, P. E. A. et al. Accuracy of rapid point-of-care serological tests for leprosy diagnosis: a systematic review and meta-analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, p. e220317, Apr. 2022. doi: 10.1590/0074-02760220317. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/4wrF6sY88LVvkc7YzPfggfL/?lang=en>. Acesso em: 14 out. 2024.

RONGIOLETTI, F.; GALLO, R.; COZZANI, E.; PARODI, A. Leprosy: a diagnostic trap for dermatopathologists in nonendemic area. **American Journal of Dermatopathology**, v. 31, n. 6, p. 607-610, ago. 2009. DOI: 10.1097/DAD.0b013e3181a105a1. Disponível em: https://journals.lww.com/amjdermatopathology/fulltext/2009/08000/leprosy__a_diagnostic_trap_for_dermatopathologists.17.aspx. Acesso em: 11 out. 2024.

ROKSNOER, L. C. et al. On the Origin of Urinary Renin: A Translational Approach. **Hypertension**, v. 67, n. 5, p. 927-933, 2016.

SADHU, S.; MITRA, D. K. Emerging Concepts of Adaptive Immunity in Leprosy.

Frontiers in Immunology, v. 9, p. 604, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00604. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.00604/full>. Acesso em: 14 out. 2024.

SANTOS, V. S. et al. Evaluation of agreement between clinical and histopathological data for classifying leprosy. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. e189-e192, mar. 2013. DOI: 10.1016/j.ijid.2012.10.003. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971212012726>. Acesso em: 14 out. 2024.

SARATH, I. M.; JOSEPH, N. M.; JAMIR, I. Quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in tissue specimens from patients with leprosy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 2, p. 345-349, Jun. 2023. doi: 10.4269/ajtmh.22-0751. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10397437/>. Acesso em: 18 out. 2024.

SALES, Anna M. et al. Leprosy among Patient Contacts: A Multilevel Study of Risk Factors. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e1013, 15 mar. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001013>. Acesso em: 18 nov. 2024.

SCOLLARD, D. M. Pathogenesis and Pathology of Leprosy. In: SCOLLARD, D. M.; GILLIS, T. P. (ed.). **International Textbook of Leprosy**. 2016. Disponível em: <https://internationaltextbookofleprosy.org/chapter/pathology>. Acesso em: 01 dez. 2022.

SHARMA, V. K.; KAUR, S.; VAISHNAVI, C.; AGNIHOTRI, N.; KAUR, I.; GANGULY, N. K. Detection of a *Mycobacterium leprae* cell wall antigen in the urine of untreated and treated patients. **Leprosy Review**, v. 63, n. 1, p. 28-35, 1992. DOI: 10.5935/0305-7518.19920005.

SILVA, K. K. P. E.; DE OLIVEIRA, E. E.; ELIAS, C. M. M. et al. Serum IgA antibodies specific to *M. leprae* antigens as biomarkers for leprosy detection and household contact tracking. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**, v. 8, p. 698495, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.698495/full>. Acesso em: 11 out. 2024.

SINGH, N. B.; CHOUDHARY, A.; BHATNAGAR, S. Detection of *M. leprae*-specific antigens with dot-ELISA in urine and nasal samples from leprosy patients. **International Journal of Leprosy Other Mycobacterial Diseases**, v. 59, n. 3, p. 398-404, 1991. PMID: 1890363.

SOKOLOWSKI, C. J.; GIOVANNITTI, J. A.; BOYNES, S. G. Needle Phobia: Etiology, Adverse Consequences, and Patient Management. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 731-744, 2010.

SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; SIMÕES QUARESMA, J. A. Leprosy as a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1635, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01635. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01635/full>. Acesso em: 05

out. 2024.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clinical Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 26-37, 2015. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X14001448>. Acesso em: 14 out. 2024.

TARIQUE, M. et al. Fate of T Cells and their Secretory Proteins During the Progression of Leprosy. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, n. 9, p. 889-899, 2018. DOI: 10.2174/1389203718666170829120729. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpps/2018/00000019/00000009/art00009>. Acesso em: 14 out. 2024.

TEIXEIRA, C. S. S. et al. Incidence of and Factors Associated With Leprosy Among Household Contacts of Patients With Leprosy in Brazil. **JAMA Dermatology**, v. 156, n. 6, p. 640, 1 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2020.0653>. Acesso em: 18 nov. 2024.

TORRES, R. T. et al. Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: A systematic review and meta-analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 100, n. 2, p. 115337, jun. 2021. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2021.115337. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889321000304>. Acesso em: 14 out. 2024.

TURNER, M. W.; ROWE, D. S. Antibodies of IgA and IgG class in normal human urine. **Immunology**, v. 12, n. 6, p. 689-99, Jun 1967.

WADE, H. W. The histoid variety of lepromatous leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 31, p. 129-142, 1963. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19642901326>. Acesso em: 01 out. 2024.

WIKER, H. G.; TOMAZELLA, G. G.; DE SOUZA, G. A. A quantitative view on Mycobacterium leprae antigens by proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1711-1719, Aug. 2011. doi: 10.1016/j.jprot.2011.01.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391911000212>. Acesso em: 04 out. 2024.

WONGPHUTORN, P. et al. Diagnostic performance of Strongyloides-specific IgG4 detection in urine for diagnosis of human strongyloidiasis. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 298, 2023.

WOO, J.; FLOYD, M.; LONGLEY, M. A.; CANNON, D. C. Radioimmunoassay for immunoglobulin G in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v. 25, n. 12, p. 2015-2019, dez. 1979. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/25/12/2015/5671557>. Acesso em: 04 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global consultation of national leprosy programme managers, partners and affected persons on Global Leprosy Strategy 2021-2023**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail->

redirect. Acesso em: 01 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Leprosy. 6th report. Technical Report Series.** WHO: Geneva; 1988, 51 p. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/37409>. Acesso em: 05 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Leprosy. 7th report. Technical Report Series.** WHO: Geneva; 1998, 52 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-874>. Acesso em: 05 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Towards Zero Leprosy. Global Leprosy (Hansen's disease) strategy 2021-2030.** New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 2021a. Acesso em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290228509>. Acesso em: 04 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leprosy (Hansen disease) update, 2023: Elimination of leprosy disease is possible – Time to act!** Weekly epidemiological record.2024;99(37):501-22

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leprosy (Hansen disease) update, 2020: impact of COVID-19 on global leprosy control.** Wkly Epidemiol Rec, v. 96, n. 36, p. 421-44, 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9636-421-444>. Acesso em: 05 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global leprosy (Hansen disease) update, 2022: new paradigm - control to elimination.** Wkly Epidemiol Rec, v. 98, n. 37, p. 409-30, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9837-409-430>. Acesso em: 05 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem.** Geneva: WHO, 2000. 40 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-CDS-CPE-CEE-2000.14>. Acesso em: 05 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy.** New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789290226383>. Acesso em: 05 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Lepra (doença de Hansen).** Doenças tropicais negligenciadas. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/leprosy-hansens-disease>. Acesso em: 05 out. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy fact sheet.** Wkly Epidemiol Rec, v. 85, n. 6, p.46-8, 2010. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer8506>. Acesso em: 05 out. 2024.

YASMIN, H. et al. Pathogenesis and Host Immune Response in Leprosy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1313, p. 155-177, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-67452-6_8. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-67452-6_8. Acesso em: 01 out.

2024.

ZHANG, X. et al. Application of commercial assays to detect IgG antibodies to hepatitis C virus in urine: a pilot study from autopsy cases. **Journal of Medical Virology**, v. 44, n. 2, p. 187-191, 1994.

ZHAO, M. et al. A comprehensive analysis and annotation of human normal urinary proteome. **Scientific Reports**, v. 7, p. 3024, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA PARA PACIENTES

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Avaliação da antigenicidade proteína quimérica recombinante utilizando urina e soro para o diagnóstico laboratorial da hanseníase”. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano, soro e urina. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. O estudo é sobre hanseníase e será desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda as explicações sobre os procedimentos que estamos propondo. Este Termo de Consentimento descreve o objetivo, os procedimentos, os benefícios, os riscos e possíveis desconfortos que este estudo possa vir a causar. Por isso, leia as informações com bastante atenção e fique à vontade para esclarecer todas as suas dúvidas.

Esta pesquisa tem como objetivo desenvolver um exame laboratorial que seja capaz de diagnosticar a hanseníase através da análise do soro e da urina. A pesquisa será desenvolvida Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, onde você será acompanhado e tratado para hanseníase. Para a confirmação do diagnóstico, você será submetido ao exame físico, biópsia de lesão de pele e coleta de raspado da pele para baciloscopia. Esses exames fazem parte da rotina de atendimento dos pacientes com hanseníase e serão realizados em todos os pacientes do Hospital Eduardo de Menezes, independentemente da participação ou não neste projeto de pesquisa. Isso se deve à importância dos exames para o diagnóstico, na correta classificação da doença e na escolha do melhor tratamento.

Se você aceitar participar da pesquisa, será necessária a coleta de uma amostra de seu sangue por punção venosa e a amostra de urina. Será colhido 15 mL de sangue do antebraço por um técnico treinado do Laboratório do Hospital Eduardo de Menezes. As amostras de sangue e urina serão usadas para realização de testes laboratoriais com o objetivo de desenvolver um exame diagnóstico para hanseníase que seja rápido, acessível e capaz de detectar a doença em sua fase inicial. Todos os exames serão custeados pela equipe da pesquisa. Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento para participar da pesquisa. As amostras de sangue e urina coletadas serão utilizadas unicamente para essa pesquisa.

Após as coletas, você já iniciará o tratamento para hanseníase. A partir dessa primeira consulta, você será acompanhado mensalmente por médicos do Hospital Eduardo de Menezes para receber o tratamento completo, que dura de seis a 12 meses, dependendo do tipo de hanseníase. O tratamento e acompanhamento mensal fazem parte da rotina de atendimento de todos os pacientes no Hospital Eduardo de Menezes, independente da participação na pesquisa. Portanto, você encontra-se livre para

abandonar a pesquisa a qualquer momento, tendo garantido a continuidade no acompanhamento e tratamento, sem qualquer prejuízo ao mesmo.

PERMISSÃO PARA CONSULTA DE DADOS: Caso você aceite o convite para participar da pesquisa, você autorizará a consulta e utilização de dados do seu prontuário médico. Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso.

RISCOS EM POTENCIAL: A coleta de sangue será de 15 ml e poderá causar dor ou mancha arroxeadada no local da punção. Para minimizar esses riscos, todos os procedimentos serão feitos com material descartável, após assepsia adequada, por equipe treinada e em um hospital no qual existe estrutura adequada para abordagem dos raros casos de intercorrência com o procedimento. Ressalta-se que as complicações citadas são infrequentes, não são graves e tendem a melhorar espontaneamente. Outros riscos, como perda do sigilo e da confidencialidade da pesquisa, são pequenos, pois serão utilizadas medidas de codificação das amostras e uso de senhas. Somente os pesquisadores terão acesso irrestrito à identificação dos participantes. E em caso de danos provenientes da pesquisa, você poderá buscar indenização nos termos da Resolução 466/12.

BENEFÍCIOS: Sua participação neste estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novos exames diagnósticos para a hanseníase, o que beneficiaria diversos pacientes. É importante ressaltar que sua participação na pesquisa não modificará seu acompanhamento e tratamento no Hospital Eduardo de Menezes.

CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações colhidas no estudo são sigilosas e você não será identificado em qualquer trabalho que resulte desta pesquisa. Somente os pesquisadores envolvidos na pesquisa e, se necessário, o Comitê de Ética em Pesquisa, terão acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

RECUSA E DESISTÊNCIA: A sua participação nesta pesquisa é voluntária e sua recusa em participar, ou seu desligamento do estudo, não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você já tem direito. Você poderá encerrar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

Você poderá refletir sobre a sua participação no estudo antes de assinar esse termo. Caso decida participar, você receberá uma via desse termo onde consta o telefone do pesquisador principal. Você poderá entrar em contato com o pesquisador para esclarecer dúvidas sobre o estudo a qualquer momento. Na sua via, também consta os telefones do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Hospital Eduardo de Menezes, caso surja alguma dúvida sobre o estudo.

Liberdade de consentimento: Concordo, voluntariamente, em participar do projeto acima proposto. Li

este formulário, ou foi lido para mim, e aceito os riscos, os regulamentos e as normas estabelecidas. Conhecendo essas condições e tendo tido a oportunidade de formular perguntas, que me foram respondidas satisfatoriamente, consinto em participar.

”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Endereço:

Telefone: E-mail:

Local: Data:

Assinatura do Paciente:

Assinatura do Pesquisador:

Para dúvidas gerais: deverá entrar em contato com o pesquisador. O Comitê de Ética poderá ser acionado em caso de surgirem dúvidas quanto aos procedimentos ÉTICOS da pesquisa.

Pesquisador responsável: Eduardo Antonio Ferraz Coelho – Telefone: (31)34099641. E-mail: eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

Pesquisador responsável no Hospital Eduardo de Menezes: Ricardo Luiz Fontes Moreira – Infectologista HEM e Preceptor do Ambulatório de Dermatologia HEM- Telefone: (31) 3328-5057. E-mail: ricardofontes@yahoo.com

CEP- UFMG: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Unidade administrativa II, sala 2005, BHM.G. Cep: 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592. E-mail: coep@prpq.ufmg.br Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 e 14:00 às 16:00 horas.

CEP- Hospital Eduardo de Menezes: Av. Doutor Cristiano Rezende, 2213, Bonsucesso, BH-MG. Cep: 30622-020. Telefone: (31) 3328-5084. E-mail: hem.cep@fhemig.mg.gov.br

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA PARA CONTROLES

TÍTULO DA PESQUISA: Avaliação da antigenicidade de proteína quimérica recombinante utilizando urina e soro para o diagnóstico da hanseníase

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Avaliação da antigenicidade de duas proteínas quiméricas recombinantes utilizando urina para o diagnóstico laboratorial da hanseníase”. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano, soro e urina. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. O estudo é sobre hanseníase e será desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais. Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda as explicações sobre os procedimentos que estamos propondo. Este Termo de Consentimento descreve o objetivo, os procedimentos, os benefícios, os riscos e possíveis desconfortos que este estudo possa vir a causar. Por isso, leia as informações com bastante atenção e fique à vontade para esclarecer todas as suas dúvidas.

Esta pesquisa tem como objetivo desenvolver um exame laboratorial que seja capaz de diagnosticar a hanseníase. Porém, é necessário a sua contribuição para servir como parâmetro de comparação (contatos hanseníase - grupo contatos intradomiciliares hanseníase). Por isso, o seu exame é importante.

Se você aceitar participar da pesquisa, será necessária a coleta de uma amostra de seu sangue por punção venosa e a amostra de urina. Será colhido 15 mL de sangue do antebraço por um técnico treinado do Laboratório do Hospital Eduardo de Menezes. As amostras de sangue e urina serão usadas para realização de testes laboratoriais. Todos os exames serão custeados pela equipe da pesquisa. Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento para participar da pesquisa. As amostras de sangue e urina coletadas serão utilizadas unicamente para essa pesquisa.

PERMISSÃO PARA CONSULTA DE DADOS: Caso você aceite o convite para participar da pesquisa, você autorizará a consulta e utilização de dados do seu prontuário médico. Todas as informações, incluindo dados clínicos e de exames complementares coletados do prontuário e gerados por este estudo, serão tratadas de modo confidencial e sigiloso.

RISCOS EM POTENCIAL: A coleta de sangue será de 15 ml e poderá causar dor ou mancha arroxeadada no local da punção. Para minimizar esses riscos, todos os procedimentos serão feitos com material descartável, após assepsia adequada, por equipe treinada e em um hospital no qual existe estrutura adequada para abordagem dos raros casos de intercorrência com o procedimento. Ressalta-se que as complicações citadas são infrequentes, não são graves e tendem a melhorar espontaneamente. Outros riscos, como perda do sigilo e da confidencialidade da pesquisa, são pequenos, pois serão utilizadas medidas de codificação das amostras e uso de senhas. Somente os pesquisadores terão acesso

irrestrito à identificação dos participantes. E em caso de danos provenientes da pesquisa, você poderá buscar indenização nos termos da Resolução 466/12.

BENEFÍCIOS: Sua participação neste estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novos exames diagnósticos, o que beneficiaria diversos pacientes. É importante ressaltar que sua participação na pesquisa não modificará sua rotina.

CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações colhidas no estudo são sigilosas e você não será identificado em qualquer trabalho que resulte desta pesquisa. Somente os pesquisadores envolvidos na pesquisa e, se necessário, o Comitê de Ética em pesquisa, terão acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

RECUSA E DESISTÊNCIA: A sua participação nesta pesquisa é voluntária e sua recusa em participar, ou seu desligamento do estudo, não acarretará penalidades ou perda de benefícios aos quais você já tem direito. Você poderá encerrar sua participação a qualquer momento, sem prejuízo para a continuidade de seu acompanhamento.

Você poderá refletir sobre a sua participação no estudo antes de assinar esse termo. Caso decida participar, você receberá uma via desse termo onde consta o telefone do pesquisador principal. Você poderá entrar em contato com o pesquisador para esclarecer dúvidas sobre o estudo a qualquer momento. Na sua via, também consta os telefones do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG e do Hospital Eduardo de Menezes, caso surja alguma dúvida sobre o estudo.

Liberdade de consentimento: Concordo, voluntariamente, em participar do projeto acima proposto. Li este formulário, ou foi lido para mim, e aceito os riscos, os regulamentos e as normas estabelecidas. Conhecendo essas condições e tendo tido a oportunidade de formular perguntas, que me foram respondidas satisfatoriamente, consinto em participar.

Eu, _____, portador do documento de Identidade fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Endereço:

Telefone: E-mail:

Local: Data:

Assinatura do Paciente:

Assinatura do Pesquisador:

Para dúvidas gerais: deverá entrar em contato com o pesquisador. O Comitê de Ética poderá ser acionado em caso de surgirem dúvidas quanto aos procedimentos ÉTICOS da pesquisa.

Pesquisador responsável: Eduardo Antonio Ferraz Coelho – Telefone: (31)34099641.

E- mail:eduardoferrazcoelho@yahoo.com.br

Pesquisador responsável no Hospital Eduardo de Menezes: Ricardo Luiz Fontes Moreira– Infectologista HEM e Preceptor do Ambulatório de DermatologiaHEM- Telefone: (31) 3328-5057. E-mail: ricardofontes@yahoo.com

CEP- UFMG: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Unidade administrativa II, sala 2005, BHMG.Cep: 31270-901. Telefone: (31) 3409-4592. E-mail: coep@prpq.ufmg.br Horário de atendimento: 09:00 às 11:00 e 14:00 às 16:00 horas.

CEP- Hospital Eduardo de Menezes: Av. Doutor Cristiano Rezende, 2213, Bonsucesso.

ANEXOS

ANEXO 1 – PARECER CONSUSBTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da antigenicidade de uma proteína quimérica recombinante e seu uso para o diagnóstico laboratorial da hanseníase

Pesquisador: Manoel Otávio da Costa Rocha

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 52767821.8.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO-CNPQ
Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.739.076

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto "Avaliação da antigenicidade de uma proteína quimérica recombinante e seu uso para o diagnóstico laboratorial da hanseníase". O objetivo da emenda é incluir a utilização de amostras biológicas (soro, urina e saliva) em área endêmica no Centro de Doenças Respiratórias Infectocontagiosas no Município de Januária, Minas Gerais.

De acordo com a hipótese dos pesquisadores, proteínas quiméricas recombinantes podem ser utilizadas no desenvolvimento de exames sorológicos para o diagnóstico da hanseníase. As proteínas quiméricas recombinantes compostas por epítopos específicos de células B de proteínas do *M. Leprae* podem possuir maior especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da Infecção causada pelo *M. leprae* e eventualmente serem usadas no prognóstico da doença após o tratamento da mesma e em indivíduos expostos ao *Mycobacterium*.

Caso os resultados sejam satisfatórios, o antígeno poderá ser incorporado em fitas imunocromatográficas de teste rápido e ser testado em condições de campo em localidades endêmicas da doença.

É prevista a inclusão de 268 participantes (Casos novos de hanseníase com as formas clínicas I, TT, DT, DD, DV e VV, com mais de 18 anos e que ainda não iniciaram o tratamento).

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Projeto: 8.739.078

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal do estudo é avaliar a antigenicidade de uma proteína quimérica recombinante, composta por epítopos de células B presentes em proteínas específicas do *M. leprae*, para o diagnóstico laboratorial da hanseníase.

Os objetivos específicos são:

- I. Avaliar o potencial antigênico e o desempenho de proteínas quimeras por meio da técnica de ELISA, utilizando amostras de soro, urina e saliva de pacientes com as formas pauci e multibacilar de hanseníase.
- II. Avaliar o potencial antigênico e o desempenho das proteínas quimeras por meio da técnica de ELISA, utilizando amostras de soro, urina e saliva de contatos de pacientes com hanseníase.
- III. Avaliar o potencial antigênico e o desempenho das proteínas quimeras por meio da técnica de ELISA, utilizando amostras de soro, urina e saliva de pacientes com doenças que podem causar reação cruzada nos ensaios, como pacientes com doença de Chagas, leishmaniose visceral (LV), leishmaniose tegumentar (LT), paracoccidiodomicose, tuberculose e de pacientes infectados com HIV.
- IV. Avaliar o desempenho antigênico das proteínas quimeras em relação aos parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, Índice Kappa de concordância entre testes, comparando os resultados com a baciloscopia em quatro sítios e com a PCR convencional.
- v. Avaliar o desempenho das proteínas quimeras em relação a parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia.
- vi. Comparar a sensibilidade e a especificidade das proteínas quiméricas em relação ao antígeno PGL-1, a ser usado como controle laboratorial

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão completos e descritos no projeto da seguinte forma:

Riscos:

O exame dermatoneurológico completo, o exame baciloscópico e o histopatológico aos quais os casos de hanseníase serão submetidos, já fazem parte da rotina de diagnóstico e acompanhamento desses pacientes no Hospital Eduardo de Menezes. Portanto, será necessária, de forma adicional, apenas a coleta de soro. Os contatos intradomiciliares dos casos índices que forem atendidos no ambulatório serão submetidos a exame clínico para avaliar a presença de hanseníase em atividade. Os contatos que tiverem a doença descartada e concordarem em participar do estudo, como controles, serão submetidos à coleta de soro.

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º Andar Sala 2005 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.275-001
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 8.739.078

A biópsia da lesão de pele apresenta como riscos: dor no local da incisão, possibilidade de infecção secundária do sítio cirúrgico e eventos adversos relacionados ao uso de anestésicos locais. A coleta da baciloscopia em quatro sítios pode acarretar dor, desconforto e sangramento no local. A coleta de soro pode causar dor, equimoses ou hematomas no local da punção. Para minimizar esses riscos, todos os procedimentos serão feitos com material descartável, após assepsia adequada e por equipe treinada. Ressalta-se que os pacientes serão recrutados em um hospital de referência no atendimento da hanseníase, no qual existe estrutura adequada para abordagem dos raros casos de intercorrência com os procedimentos citados.

Todos os pacientes com hanseníase, sejam eles participantes ou não do estudo, serão acompanhados durante todo o tempo de tratamento da doença pela equipe do Hospital Eduardo de Menezes. Os contatos dos casos índice também serão acompanhados devido ao risco de desenvolver a hanseníase em algum momento.

Os resultados da pesquisa serão publicados independentemente do desfecho final e o sigilo das informações dos pacientes será preservado em todas as fases do estudo.

Benefícios:

A hanseníase permanece como um importante problema de saúde pública em diversos países e pode acarretar neuropatia periférica e sequelas neurológicas permanentes. Para que o tratamento com PQT seja eficaz na prevenção de incapacidades decorrentes da hanseníase, ele deve ser instituído precocemente, de modo a interromper a evolução da doença antes do surgimento de neuropatia periférica. Contudo, o diagnóstico tardio permanece um sério problema, acarretando continuidade na cadeia de transmissão e aumento do risco de incapacidades. Um dos principais fatores que contribuem para o atraso diagnóstico é a ausência de um exame laboratorial com acurácia suficiente para o diagnóstico de hanseníase. O presente estudo poderá resultar no desenvolvimento de um teste laboratorial de fácil execução, baixo custo e que seja capaz de detectar as fases iniciais e oligossintomáticas da doença, o que pode contribuir substancialmente para o diagnóstico precoce e a prevenção de incapacidade.

A proteína quimérica aplicada no sorodiagnóstico da hanseníase poderá render o depósito de patente, além da confecção de trabalhos científicos originais para serem submetidos para publicação em revistas científicas indexadas internacionalmente. Além disso, os resultados obtidos serão divulgados em congressos científicos e tecnológicos de relevância nacional e internacional por meio de diversos trabalhos completos e na forma de resumos. O projeto pode ser considerado de caráter translacional e inovador, uma vez que procurará agregar e integrar

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3408-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 6.739.070

as áreas básica e aplicada, na formulação de um teste rápido sensível e específico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O desfecho do estudo prevê o desenvolvimento de um teste sorológico sensível e específico para o diagnóstico de hanseníase e de uma plataforma de teste rápido de fácil aplicabilidade na rotina diagnóstica dessa doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos necessários foram apresentados e estão de acordo com as normas éticas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo aprovação da emenda.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações_BASICAS_226653_3_É1.pdf	19/12/2023 11:11:05		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	19/12/2023 10:51:25	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	19/12/2023 10:50:38	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE5.docx	18/12/2023 16:19:43	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE4.docx	18/12/2023 16:19:27	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de	TCLE3.docx	18/12/2023	Manoel Otávio da	Acelto

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: ccep@prp.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.739.070

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE3.docx	16:19:12	Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.docx	18/12/2023 16:18:56	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE1.docx	18/12/2023 16:18:26	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Outros	PREFEITURA.pdf	18/12/2023 15:58:34	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Outros	CARTA AO CEP JUSTIFICATIVA DE EMENDA assinado 29 assinado.pdf	18/12/2023 15:56:46	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Declaração de concordância	CARTAPREFEITO.pdf	18/12/2023 15:52:49	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Outros	cartaresposta5240457.pdf	16/03/2022 20:23:52	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.pdf	16/03/2022 20:22:07	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontroles.pdf	16/03/2022 20:21:36	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEpacientes.pdf	16/03/2022 20:21:05	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado_finalizado.pdf	03/02/2022 10:17:41	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Parecer Anterior	parecerUFMG.pdf	17/09/2021 10:31:02	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
Folha de Rosto	folharosto.pdf	13/09/2021 10:50:57	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Processo: 6.739.076

BELO HORIZONTE, 02 de Abril de 2024

Assinado por:
Corinne Davis Rodrigues
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 8627 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.275-901
UF: MG Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO 2 – PARECER 2 CONSUSBTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da antigenicidade de duas proteínas quiméricas recombinantes utilizando urina para o diagnóstico laboratorial da hanseníase. Fase II

Pesquisador: EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77392724.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.726.834

Apresentação do Projeto:

A hanseníase continua sendo um desafio à população brasileira. O Brasil, em média, registrava cerca de 30 mil novos casos por ano antes da pandemia, mas a Sociedade Brasileira de Hansenologia alerta que existem de três a cinco vezes mais casos sem diagnóstico e uma endemia oculta ζ altíssima ζ de hanseníase. Significa que há milhares de pessoas sem tratamento, sofrendo sequelas que surgem com o avanço da doença ζ e

poderiam ser evitadas ζ e transmitindo o bacilo a pessoas saudáveis. O país vem registrando um aumento do percentual de pessoas diagnosticadas com grau 2 de incapacidade física (sequelas incapacitantes) como consequência de diagnósticos tardios. Além disso, há muitos casos diagnosticados em crianças, o que indica uma alta circulação do bacilo nas comunidades. O diagnóstico da hanseníase é primordialmente clínico, portanto, depende do reconhecimento de sintomas característicos. Porém, alguns casos são desafiadores para se dar um diagnóstico baseado apenas pela clínica. Há vários testes disponíveis, entretanto, até o momento, não existem exames laboratoriais de elevada acurácia para diagnosticar a hanseníase. Portanto, o desenvolvimento de um teste laboratorial de fácil execução, baixo custo e que seja capaz de detectar as fases iniciais e oligossintomáticas da doença pode contribuir substancialmente para o diagnóstico precoce e a prevenção de incapacidades. O

estudo tem como objetivo avaliar a antigenicidade de duas proteínas quiméricas em urina e soro de pacientes e contactantes de hanseníase. As quimeras já estão disponíveis e foram

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31) 3409-4362

E-mail: cep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.726.834

testadas previamente. Dessa forma, pretende-se desenvolver um teste rápido, acessível e de elevada acurácia utilizando urina como amostra biológica. Durante a realização deste trabalho, as duas proteínas serão testadas na urina e no soro de pacientes acometidos pela doença e seus contatos intradomiciliares. Ainda serão coletadas amostras de pacientes com outras doenças relacionadas, com reações cruzadas descritas na literatura, com o objetivo de desenvolver uma plataforma de teste rápido sensível e específico para hanseníase. As amostras de soro e urina serão colhidas no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes e serão avaliadas no laboratório de Infectologia e Medicina Tropical (PPG-IMT) da UFMG.

Hipótese: Antigenicidade de duas proteínas quiméricas na urina para o diagnóstico da hanseníase.

Metodologia Proposta:

O exame dermatoneurológico completo, o exame baciloscópico e o histopatológico aos quais os casos de hanseníase são submetidos, já fazem parte da rotina de diagnóstico e acompanhamento desses pacientes no Hospital Eduardo de Menezes. Portanto, será necessária, de forma adicional, apenas a coleta de soro e urina. Os contatos intradomiciliares dos casos índices que forem atendidos no ambulatório serão submetidos a exame clínico para avaliar a presença de hanseníase em atividade. Os contatos que tiverem a doença descartada e concordarem em participar do estudo, como controles, serão submetidos à coleta de soro e urina.

A biópsia da lesão de pele apresenta como riscos: dor no local da incisão, possibilidade de infecção secundária do sítio cirúrgico e eventos adversos relacionados ao uso de anestésicos locais. A coleta da baciloscopia em quatro sítios pode acarretar dor, desconforto e sangramento no local. A coleta de soro pode causar dor, equimoses ou hematomas no local da punção. Para minimizar esses riscos, todos os procedimentos serão feitos com material descartável, após assepsia adequada e por equipe treinada. Ressalta-se que os pacientes serão recrutados em um hospital de referência no atendimento da hanseníase, no qual existe estrutura adequada para abordagem dos raros casos de intercorrência com os procedimentos citados. A coleta de urina não envolve riscos potenciais.

Todos os pacientes com hanseníase, participantes ou não do estudo, serão acompanhados

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31) 3409-4592 **E-mail:** ccep@ppq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 6.726.834

durante todo o tempo de tratamento da doença pela equipe do Hospital Eduardo de Menezes. Os contatos dos casos índice também serão acompanhados devido ao risco de desenvolver a hanseníase em algum momento.

Os resultados da pesquisa serão publicados independentemente do desfecho final e o sigilo das informações dos pacientes será preservado em todas as fases do estudo.

A hanseníase permanece como um importante problema de saúde pública em diversos países e pode acarretar neuropatia periférica e sequelas neurológicas permanentes. Para que o tratamento com PQT seja eficaz na prevenção de incapacidades decorrentes da hanseníase, ele deve ser instituído precocemente, de modo a interromper a evolução da doença antes do surgimento de neuropatia periférica. Contudo, o diagnóstico tardio permanece um sério problema, acarretando continuidade na cadeia de transmissão e aumento do risco de incapacidades. Um dos principais fatores que contribuem para o atraso diagnóstico é a ausência de um exame laboratorial com acurácia suficiente para o diagnóstico de hanseníase. O presente estudo poderá resultar no desenvolvimento de um teste laboratorial de fácil execução, baixo custo e que seja capaz de detectar as fases iniciais e oligossintomáticas da doença, o que pode contribuir substancialmente para o diagnóstico precoce e a prevenção de incapacidades.

As proteínas quiméricas testadas na urina poderão render a confecção de trabalhos científicos originais para publicação em revistas indexadas internacionalmente (QUALIS A1 ou A2 da CAPES). Além disso, os resultados serão divulgados em congressos científicos de relevância internacional por meio de trabalhos completos e sob a forma de resumos. O projeto pode ser considerado de caráter translacional, uma vez que procurará agregar e integrar as áreas básica e aplicada, na formulação de um teste diagnóstico sensível e específico. Os pontos de corte (cut-off) para validação da sensibilidade e especificidade das quimeras recombinantes serão determinados após a construção de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic). Na etapa de análise do desempenho dos ensaios, serão avaliados os seguintes parâmetros:

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31) 3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 6.726.634

sensibilidade (Se), especificidade (Es), área sob a curva (AUC), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de probabilidade positiva (RP+), razão de probabilidade negativa (RP-). Todas as análises serão realizadas utilizando o programa computacional GraphPad Prism™ (versão 5.0 for Windows).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a antigenicidade de duas proteínas quiméricas recombinantes compostas por epítopos específicos de células B de proteínas do *M. leprae* para o diagnóstico da hanseníase causada por formas PB e MB da doença usando urina e soro dos pacientes.

Objetivo Secundário:

- i. Avaliar o potencial antigênico e o desempenho das proteínas quimeras por meio da técnica de ELISA, utilizando amostras de urina de pacientes com formas PB e MB de hanseníase, bem como urina de contatos e de pacientes com doenças que podem apresentar reação cruzada, como Doença de Chagas, leishmanioses visceral (LV) e tegumentar (LT), paracoccidiodomicose, tuberculose e de pacientes infectados com HIV.
- ii. Usar amostras de soro em paralelo para comparar a eficácia da urina como amostra biológica.
- iii. Avaliar o desempenho antigênico das quimeras em relação aos parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, índice Kappa de concordância entre testes, comparando os resultados com a baciloscopia em quatro sítios e com a PCR convencional.
- iv. Avaliar o desempenho da quimera em relação a parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia.
- v. Comparar a sensibilidade e a especificidade das proteínas quiméricas em relação ao antígeno PGL-1.
- i. Avaliar o potencial antigênico e o desempenho das proteínas quimeras por meio da técnica de ELISA, utilizando amostras de urina de pacientes com formas PB e MB de hanseníase, bem como urina de contatos e de pacientes com doenças que podem apresentar reação cruzada, como Doença de Chagas, leishmanioses visceral (LV) e tegumentar (LT), paracoccidiodomicose,

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31) 3409-4592

E-mail: ccep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 6.726.824

tuberculose e de pacientes infectados com HIV.

- ii. Usar amostras de soro em paralelo para comparar a eficácia da urina como amostra biológica.
- iii. Avaliar o desempenho antigênico das quimeras em relação aos parâmetros de sensibilidade, especificidade, acurácia, Índice Kappa de concordância entre testes, comparando os resultados com a baciloscopia em quatro sítios e com a PCR convencional.
- iv. Avaliar o desempenho da quimera em relação a parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia.
- v. Comparar a sensibilidade e a especificidade das proteínas quiméricas em relação ao antígeno PGL-1.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não se aplica (Dado continua sendo informado pelos autores, mesmo após Parecer anterior. Não existe pesquisa sem risco, considerados riscos do projeto). O exame dermatoneurológico completo, o exame baciloscópico e o histopatológico aos quais os casos de hanseníase serão submetidos, já fazem parte da rotina de diagnóstico e acompanhamento desses pacientes no Hospital Eduardo de Menezes. Portanto, será necessária, de forma adicional, apenas a coleta de soro e urina. Os contatos intradomiciliares dos casos índices que forem atendidos no ambulatório serão submetidos a exame clínico para avaliar a presença de hanseníase em atividade. Os contatos que tiverem a doença descartada e concordarem em participar do estudo, como controles, serão submetidos à coleta de soro e urina.

A biópsia da lesão de pele apresenta como riscos: dor no local da incisão, possibilidade de infecção secundária do sítio cirúrgico e eventos adversos relacionados ao uso de anestésicos locais. A coleta da baciloscopia em quatro sítios pode acarretar dor, desconforto e sangramento no local. A coleta de soro pode causar dor, equimoses ou hematomas no local da punção. Para minimizar esses riscos, todos os procedimentos serão feitos com material descartável, após assepsia adequada e por equipe treinada. Ressalta-se que os pacientes serão recrutados em um hospital de referência no atendimento da hanseníase, no qual existe estrutura adequada para abordagem dos raros casos de intercorrência com os procedimentos citados. A coleta de urina não envolve riscos potenciais.

Benefícios:

A hanseníase permanece como um importante problema de saúde pública em diversos países e pode acarretar neuropatia periférica e sequelas

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2ª. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3492-4992

E-mail: cosp@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.726.834

neurológicas permanentes. Para que o tratamento com TQT seja eficaz na prevenção de incapacidades decorrentes da hanseníase, ele deve ser instituído precocemente, de modo a interromper a evolução da doença antes do surgimento de neuropatia periférica. Contudo, o diagnóstico tardio permanece um sério problema, acarretando continuidade na cadeia de transmissão e aumento do risco de incapacidades. Um dos principais fatores que contribuem para o atraso diagnóstico é a ausência de um exame laboratorial com acurácia suficiente para o diagnóstico de hanseníase. O presente estudo poderá resultar no desenvolvimento de um teste laboratorial de fácil execução, baixo custo e que seja capaz de detectar as fases iniciais e oligossintomáticas da doença, o que pode contribuir substancialmente para o diagnóstico precoce e a prevenção de incapacidades. As proteínas quiméricas testadas na urina poderão render a confecção de trabalhos científicos originais para publicação em revistas indexadas internacionalmente (QUALIS A1 ou A2 da CAPES). Além disso, os resultados serão divulgados em congressos científicos de relevância internacional por meio de trabalhos completos e sob a forma de resumos. O projeto pode ser considerado de caráter translacional, uma vez que procurará agregar e integrar as áreas básica e aplicada, na formulação de um teste diagnóstico sensível e específico.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto relevante para a área da saúde, conforme parecer da Câmara Departamental de CLM PARECER CLM 008-23 e atende os preceitos éticos. Possui co-participação da FHEMIG. O projeto é uma parte do projeto de pós-doutorado e terá financiamento pela FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA FAPEMIG DO ESTADO DE MINAS GERAIS. O desenho do estudo é observacional e prospectivo, possui um grupo controle. TCLE apresentado como carta convite, resguardando a confidencialidade dos dados, o anonimato, o direito à recusa, e desistir do projeto a qualquer momento sem qualquer prejuízo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de rosto preenchida e assinada ok
- 2) Aprovação da Câmara Departamental. ok
- 3) Carta de anuência ok
- 5) Instrumentos de coleta de ok

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31) 3409-4502

E-mail: ccap@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 6.726.934

6) Projeto completo ok

7) TCLE como carta convite, resguardando a confidencialidade dos dados, o anonimato, o direito à recusa, e desistir do projeto a qualquer momento sem qualquer prejuízo.

ok

8) Termos de constituição de biorepositório, caso a pesquisa envolva armazenamento de dados biológicos.

Ok

Recomendações:

Quando do preenchimento da Plataforma Brasil para qualquer projeto ter sempre o cuidado de manter as informações alinhadas da brochura do pesquisador, campos da PB e TCLE.

Não existe pesquisa sem riscos.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Na condição de se atender as recomendações solicitadas, sou, S.M.J. favorável à aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P RJETO_2284819.pdf	19/03/2024 19:21:55		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	19/03/2024 19:21:17	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Outros	QuestionarioRC.pdf	19/03/2024 19:20:15	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Outros	QuestionarioPH.pdf	19/03/2024 19:18:39	Manoel Otávio da Costa Rocha	Aceito
Projeto Detalhado	Projeto.docx	19/03/2024	Manoel Otávio da	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31) 4024-4222

E-mail: ccep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.796.834

/ Brochura Investigador	Projeto.docx	19/03/2024 19:17:47	Costa Rocha	Acelto
Outros	Cartacep_assinado.pdf	19/03/2024 19:14:50	Manoel Otávio da Costa Rocha	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLERC.docx	19/03/2024 15:53:39	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLENI.docx	19/03/2024 15:53:15	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECH.docx	19/03/2024 15:53:01	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	19/03/2024 15:52:39	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Parecer Anterior	RespostaCarta.pdf	07/02/2024 17:10:09	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Outros	Planotrabahio.pdf	07/02/2024 17:09:43	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Outros	Cartajustificativa2.pdf	07/02/2024 17:08:55	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Outros	Cartajustificativa.pdf	07/02/2024 17:08:37	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Outros	TermoBiomepositorio.pdf	07/02/2024 17:06:20	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Outros	CartaAnuencialInfectologia.pdf	07/02/2024 17:05:46	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Outros	TCUD.pdf	07/02/2024 17:05:01	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Solicitação registrada pelo CEP	Carta_Resposta.pdf	07/02/2024 17:03:30	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto
Parecer Anterior	Parecer.pdf	07/02/2024 17:02:51	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Acelto

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª. Andar - Sala 2005 - Campus Pampulha
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: cep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 6.726.834

Parecer Anterior	PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_224_9301.pdf	07/02/2024 17:01:29	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Aceito
Parecer Anterior	PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_221_6718.pdf	07/02/2024 17:01:11	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_RETIRADO.pdf	07/02/2024 17:00:35	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_6589986_E2.pdf	07/02/2024 17:00:14	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Aceito
Declaração de concordância	TermoFhemig.pdf	07/02/2024 16:59:27	EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 26 de Março de 2024

Assinado por:

Corinne Davis Rodrigues
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar Sala 2005 Campus Pampulha

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br