

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

Bárbara Proença Nardi Assis

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS PARA O  
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HANSENÍASE**

Belo Horizonte  
2024

Bárbara Proença Nardi Assis

**CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS PARA O  
DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HANSENÍASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical

Orientador: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha – UFMG

Coorientadores: Prof. Dra. Ana Thereza Chaves Lages – UFMG  
Prof. Dr. Eduardo Antônio Ferraz Coelho – UFMG

Belo Horizonte

2024

AS848c Assis, Bárbara Proença Nardi.  
Construção e avaliação de proteínas quiméricas para o diagnóstico sorológico da hanseníase [recursos eletrônicos]. / Bárbara Proença Nardi Assis. - - Belo Horizonte: 2024.  
111.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Manoel Otávio da Costa Rocha.  
Coorientador (a): Ana Thereza Chaves Lages; Eduardo Antônio Ferraz Coelho.  
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Diagnóstico. 3. Sorologia. 4. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 5. Proteínas Recombinantes de Fusão. 6. Dissertação Acadêmica. I. Rocha, Manoel Otávio da Costa. II. Lages, Ana Thereza Chaves. III. Coelho, Eduardo Antônio Ferraz. 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 TESE**

Aos quinze dias do mês de março de dois mil e vinte e quatro (15/03/2024), às 14:00 (quatorze) horas, na sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a 226ª defesa de tese de **BÁRBARA PROENÇA NARDI ASSIS**, número de registro 2020658237, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS DA SAÚDE. A presidência da sessão coube ao **PROF. MANOEL OTÁVIO DA COSTA ROCHA**, orientador principal. Inicialmente, o presidente fez a apresentação dos demais componentes da Comissão Examinadora, assim constituída: **PROF. MANOEL OTAVIO DA COSTA ROCHA - ORIENTADOR (UFMG)**, **DRA. ANA THEREZA CHAVES - COORIENTADORA (UFMG)**, **PROF. EDUARDO ANTONIO FERRAZ COELHO - COORIENTADOR (UFMG)**, **PROF. RICARDO TOSHIO FUJIWARA (UFMG)**, **PROFA. MARIA APARECIDA DE FARIA GROSSI (SESMG)**, **PROFA. ISABELA MARIA BERNARDES GOULART (UFU)**, **PROF. ALEXSANDRO SOBREIRA GALDINO (UFSJ)**. Em seguida, a candidata fez a apresentação de sua Tese de Doutorado, intitulada: **"CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE PROTEÍNAS QUIMÉRICAS PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HANSENÍASE"**. Seguiu-se à arguição pela Comissão Examinadora, com a respectiva defesa da aluna. Logo após, a Comissão reuniu-se sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado da avaliação do trabalho final da aluna e considerou a tese **APROVADA**, com voto unânime de louvor. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata e ao público, pelo presidente da Comissão. Conforme arts. 76 e 77 das Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG, as defesas de dissertação e tese são públicas. 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 da Comissão Examinadora presente através do SEI (Sistema Eletrônico de Informações) do Governo Federal.

Belo Horizonte, 15 de março de 2024.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por Manoel Otavio da Costa Rocha, Professor do Magistério Superior, em 18/03/2024, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Eduardo Antonio Ferraz Coelho, Coordenador(a) de curso de pós-graduação, em 18/03/2024, às 09:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 3º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Maria Bernardes Goulart**, Usuária Externa, em 18/03/2024, às 09:50, 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 18/03/2024, às 10:13, 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 **Alexsandro Sobreira Galdino**, Usuário Externo, em 18/03/2024, às 10:28, 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 Toshio Fujiwara**, Professor do Magistério Superior, em 18/03/2024, às 13:15, 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 **Maria Aparecida de Faria Grossi**, Usuário Externo, em 18/03/2024, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3062262 e o código CRC E36334E2.

---

À minha querida família, que sempre me apoiou nos momentos difíceis, aos que estão presentes e àqueles que já se foram, mas permanecem no coração. Amo vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador, Professor Manoel Otávio da Costa Rocha por toda a sua sabedoria, dedicação e disponibilidade em me auxiliar, desde meus primeiros passos na pesquisa científica até a finalização desta tese de doutorado.

Aos meus coorientadores Professora Ana Thereza Chaves Lages e Professor Eduardo Antônio Ferraz Coelho que me orientaram neste novo caminho de pesquisa translacional e sem os quais este trabalho não seria possível.

Agradeço a toda a equipe do laboratório de Infectologia e Medicina Tropical (UFMG) e do Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses do Departamento de Patologia Clínica do Colégio Técnico da UFMG, em especial à Doutora Daniela Pagliara Lage que coordenou a execução dos experimentos.

Ao Professor Ricardo Andrez Machado de Ávila que nos auxiliou nas análises de bioinformática para a construção das proteínas quiméricas usadas neste estudo.

Ao Professor Ricardo Toshio Fujiwara que gentilmente nos cedeu amostras de soro de contatos intradomiciliares de hanseníase e disponibilizou a estrutura do Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG) para que eu pudesse aprender um pouco das técnicas laboratoriais que foram aplicadas neste trabalho. Agradeço também à toda a equipe do LICP, em especial aos Doutores Ana Laura Grossi de Oliveira, Williane Fernanda Siqueira e Augusto César Parreiras de Jesus, por terem me acompanhado nas visitas ao laboratório e que muito contribuíram para meu aprendizado.

A todos os membros da equipe do Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes (HEM), que cuidam dos pacientes com hanseníase com atenção e respeito. Meu agradecimento especial à Doutora Sandra Lyon que, além de ser uma referência na hansenologia, sempre foi minha maior incentivadora na carreira acadêmica e científica. Aos funcionários do Laboratório do HEM, em especial à Juliana Carvalho Martins, que me auxiliaram nas coletas dos soros.

Por fim, meu especial agradecimento aos pacientes com hanseníase participantes do estudo. Espero que o conhecimento gerado por este trabalho possa, em algum momento, auxiliar no controle da doença.

## RESUMO

O diagnóstico precoce da hanseníase é importante para prevenir incapacidades e interromper a cadeia de transmissão. Contudo, até o momento, nenhum teste laboratorial se mostrou suficiente para diagnosticar a doença, principalmente, as formas paucibacilares, nas quais se observa menor carga bacilar, o que contribui para o atraso no diagnóstico. O presente estudo teve como objetivo avaliar a antigenicidade de duas proteínas quiméricas inéditas e testar sua aplicabilidade no diagnóstico sorológico da hanseníase. As quimeras, denominadas M1 e M2, foram desenhadas por programas de bioinformática a partir de epítomos de linfócitos B presentes em proteínas específicas do *Mycobacterium leprae*, e seus genes foram sintetizados. As proteínas foram expressas em bactérias *Escherichia coli* Artic Express e purificadas por cromatografia de afinidade. O desempenho das proteínas para o sorodiagnóstico da hanseníase foi avaliado por ensaios de ELISA utilizando amostras de soro de 41 casos novos de hanseníase, 64 controles sem comorbidades conhecidas e de 118 pacientes com outras doenças infecciosas. A proteína M1 apresentou sensibilidade de 100% para o diagnóstico das formas clínicas paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) em uma população sem doenças conhecidas. Na comparação entre os resultados dos casos de hanseníase e dos pacientes com outras doenças, a M1 apresentou sensibilidade de 92.0% para diagnóstico de casos MB e 75.0% para detecção dos casos PB. A proteína M2 apresentou sensibilidade de 80.0% para diagnóstico de casos MB e 75.0% para diagnóstico de casos PB, em uma população sem doenças conhecidas. Na comparação entre os resultados dos casos de hanseníase e dos pacientes com outras doenças, a M2 apresentou sensibilidade de 80.0% para diagnóstico de casos MB e de 62.5% para detecção de casos PB. As duas quimeras apresentaram especificidade de 98.4% para diagnóstico de hanseníase em população saudável. A especificidade foi de 99.2% na comparação entre os resultados dos casos de hanseníase e dos pacientes com outras doenças. O estudo também avaliou amostras de soro de 118 contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase. As taxas de soropositividade foram maiores nos contatos de hanseníase do que nos controles sem comorbidades ou com outras doenças infecciosas. De forma geral, as quimeras M1 e M2 apresentaram elevada sensibilidade e especificidade para diagnóstico dos casos MB e PB, demonstrando que as mesmas são antígenos promissores para o sorodiagnóstico de hanseníase. Destaca-se ainda a elevada sensibilidade da quimera M1 para a detecção de casos PB. Dessa forma, as proteínas M1 e M2 poderiam ser consideradas como candidatas a estudos futuros para o diagnóstico da hanseníase, contribuindo para detecção e tratamento mais precoce, redução da transmissão e prevenção de incapacidades.

Palavras-chave: hanseníase, diagnóstico, sorologia, ensaio de imunoabsorção enzimática, proteínas recombinantes de fusão.



## ABSTRACT

An early diagnosis of leprosy is important to prevent disabilities and to interrupt the disease' transmission chain. However, to date, no laboratory test is sufficient to diagnose the disease, especially the paucibacillary forms, in which a lower bacillary index is found, which contributes to diagnostic delays. The present study aimed to evaluate the antigenicity of two new chimeric proteins and test their applicability in the serological diagnosis of leprosy. The proteins, called M1 and M2, were designed by bioinformatics based on selection of specific B-cell epitopes derived from *Mycobacterium leprae* proteins, and their genes were synthesized. The proteins were expressed in *Escherichia coli* Arctic Express bacteria and purified by affinity chromatography. The performance of the chimeric proteins for the serodiagnosis of leprosy was evaluated by ELISA by using sera samples from 41 new cases of leprosy, 64 controls without comorbidities and 118 patients with other infectious diseases. The M1 protein showed 100% sensitivity for the diagnosis of paucibacillary (PB) and multibacillary (MB) forms of leprosy in a healthy population. Comparing the results of leprosy cases and those with other infectious diseases, M1 presented a sensitivity of 92.0% for MB cases and 75.0% for PB cases. The M2 protein showed a sensitivity of 80.0% for MB cases and 75.0% for PB cases, in a population without known diseases. Comparing the results of leprosy cases and those with other diseases, M2 presented a sensitivity of 80.0% for MB cases and 62.5% for PB cases. The two chimeras showed a specificity of 98.4% for the diagnosis of leprosy in a healthy population. The specificity was 99.2%, when the results of leprosy patients were compared with those of patients with other infectious diseases. The study also evaluated serum samples from 118 household contacts of leprosy patients. Seropositivity rates were higher in leprosy contacts than in controls without comorbidities or with other infectious diseases. In general, the M1 and M2 chimeras showed high sensitivity and specificity for diagnosing MB and PB cases, demonstrating that they are promising antigens for the serodiagnosis of leprosy. The greater sensitivity of the M1 chimera for detecting PB cases is also noteworthy. Therefore, the M1 and M2 proteins could be considered as candidates for future studies for the diagnosis of leprosy, contributing to earlier detection and treatment, reduction of transmission and prevention of disabilities.

Keywords: leprosy, diagnosis, serology, enzyme-linked immunosorbent assay, recombinant fusion proteins.

## PREFÁCIO

Eu, Bárbara Proença Nardi Assis, sou médica graduada pela Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em 2003. Em 2004, iniciei Residência em Clínica Médica no Hospital Alberto Cavalcanti, da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG). Durante a residência no Hospital Eduardo de Menezes - FHEMIG, tive o primeiro contato com a área de Infectologia e Dermatologia Sanitária, que despertou meu interesse desde o início. Em 2007, fui aprovada no Programa de Residência Médica de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes, com duração de três anos. Durante esse período, tive oportunidade de acompanhar diversos pacientes com dermatoses graves, infecciosas ou não. A doença que sempre me despertou mais interesse foi a hanseníase, devido sua complexidade, variabilidade clínica, dificuldades diagnósticas e potencial gravidade. Além disso, trata-se de uma doença endêmica no Brasil, altamente negligenciada e com várias lacunas de conhecimento, o que torna a hansenologia uma área promissora para o desenvolvimento de estudos.

Logo após o término da Residência em Dermatologia, em 2010, fui aprovada em concurso público da rede FHEMIG e fui trabalhar como dermatologista no Ambulatório de Hanseníase da antiga Colônia Santa Izabel. Nesse período, dediquei-me exclusivamente ao atendimento de pacientes com hanseníase em atividade e daqueles com sequelas da doença. Em 2011, fui transferida para o Hospital Eduardo de Menezes para trabalhar como preceptora da Residência Médica de Dermatologia. Nesse hospital, atendemos grande número de pacientes com doenças dermatológicas infecciosas, como leishmaniose, esporotricose, paracoccidioidomicose, dentre outras. Contudo, a maior ênfase do serviço é dada ao atendimento multidisciplinar dos pacientes com hanseníase ou com sequelas da doença, contando, para isso, com médicos dermatologistas e de outras especialidades, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais, enfermeiros especialistas em curativos e psicólogos. A coordenadora do Serviço de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes é a Professora Dra. Sandra Lyon, que, sabendo do meu interesse na área acadêmica, apresentou-me ao Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, Professor Titular da Faculdade de Medicina da UFMG.

Assim, em 2011, iniciei o mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da UFMG, tendo como

orientador o Professor Manoel Otávio e, como coorientadora, a Professora Sandra Lyon. Desenvolvemos a pesquisa intitulada “Fatores de risco para desenvolvimento de incapacidade física em casos novos de hanseníase, notificados em serviço de referência de Belo Horizonte, no período de 2005-2010”. A dissertação foi apresentada em 2013, quando obtive o título de Mestre. Desde então, além das atividades clínicas no Hospital Eduardo de Menezes, atuo também na área acadêmica como professora da disciplina de Dermatologia do Centro Universitário de Belo Horizonte (UNI-BH).

Durante o meu mestrado, fui apresentada pelo Professor Manoel Otávio à Doutora Ana Thereza Chaves com o intuito de desenvolver uma linha de pesquisa em hanseníase envolvendo o Hospital Eduardo de Menezes e o Laboratório de Infectologia e Medicina Tropical da UFMG. Após algumas reuniões, decidimos estudar proteínas recombinantes com potencial para desenvolvimento de testes sorológicos, uma vez que a dificuldade no diagnóstico da hanseníase é um dos principais problemas enfrentados no ambulatório. Com esse objetivo, fui apresentada ao Professor Eduardo Antônio Ferraz Coelho, que nos auxiliou no desenvolvimento do projeto e disponibilizou laboratório e equipamentos para a realização dos experimentos. Dessa forma, iniciamos esse estudo translacional que também contou com a colaboração do Professor Ricardo Andrez Machado de Ávila, da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), que auxiliou na construção das proteínas quiméricas usadas neste estudo, e do Professor Ricardo Toshio Fujiwara (UFMG), que nos cedeu amostras de soro de contatos intradomiciliares de hanseníase.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Sequência de aminoácidos das quatro regiões epitópicas selecionadas para compor a proteína quimérica M1, provenientes das proteínas ML0369, ML0447, ML0959 e ML2346. ....58
- Figura 2: Sequência de aminoácidos das três regiões epitópicas selecionadas para compor a proteína quimérica M2, provenientes das proteínas ML0126 e ML1057. ...58
- Figura 3: Confirmação da presença de epítomos de células B na construção final da proteína quimérica M1.....59
- Figura 4: Confirmação da presença de epítomos de células B na construção final da proteína quimérica M2.....59
- Figura 5: Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína M1 (~10 kDa). Passagem, lavagem e eluição (eluição 1 e 2) da proteína após a purificação foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE 12%, corado com coomassie brilhante blue G-250.....61
- Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína M2 (~18 kDa). Passagem, lavagem e eluição (eluição 1 e 2) da proteína após a purificação foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE 12%, corado com coomassie brilhante blue G-250.....62
- Figura 7: Resultados do ELISA anti-M1 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), controles sem doenças conhecidas (CE) e pacientes com outras doenças infecciosas (DI). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo.....64
- Figura 8: Resultados do ELISA anti-M1 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), doença de Chagas, leishmaniose visceral (LVH), leishmaniose tegumentar

americana (LTA), malária, tuberculose pulmonar (TBC) e infecção pelo HIV. Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo. ....65

Figura 9: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M1 em pacientes PB e MB em comparação com controles sem doenças conhecidas moradores de Belo Horizonte. ....65

Figura 10: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M1 em pacientes MB (A) e PB (B) em comparação com pacientes com outras doenças infecciosas. ....66

Figura 11: Resultados do ELISA anti-M2 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), controles sem doenças conhecidas (CE) e pacientes com outras doenças infecciosas (DI). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo. ....68

Figura 12: Resultados do ELISA anti-M2 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), doença de Chagas, leishmaniose visceral (LVH), leishmaniose tegumentar americana (LTA), malária, tuberculose pulmonar (TBC) e infecção pelo HIV. Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo. ....68

Figura 13: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M2 em pacientes MB (A) e PB (B) em comparação com controles sem doenças conhecidas moradores de Belo Horizonte. ....69

Figura 14: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M2 em pacientes MB (A) e PB (B) em comparação com pacientes com outras doenças infecciosas. ....70

Figura 15: Resultados do ELISA anti-M1 nos grupos multibacilar (casos MB), paucibacilar (casos PB), contatos intradomiciliares de caso índice MB (contatos MB)

e de contatos intradomiciliares de caso índice PB (contatos PB). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo. ....71

Figura 16: Resultados do ELISA anti-M2 nos grupos multibacilar (casos MB), paucibacilar (casos PB), contatos intradomiciliares de caso índice MB (contatos MB) e de contatos intradomiciliares de caso índice PB (contatos PB). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo. ....73

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Análise de similaridade das nove proteínas selecionadas por proteômica com proteínas do *M. leprae* e de outras espécies do gênero *Mycobacterium*. .....56
- Tabela 2: Análise de similaridade das oito proteínas selecionadas por genômica com proteínas do *M. leprae* e de outras espécies do gênero *Mycobacterium*. .....57
- Tabela 3: Características clínicas dos 41 casos novos de hanseníase diagnosticados no Hospital Eduardo de Menezes, no período de abril de 2022 a novembro de 2023. ....63
- Tabela 4: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M1 medidos em valores de densidade óptica (DO) nos grupos casos multibacilares (MB), casos paucibacilares (PB), controles sem doenças conhecidas e pacientes com outras doenças infecciosas. ....64
- Tabela 5: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M1 dos casos MB e PB em comparação com controles sem doenças conhecidas (CE), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95). ....66
- Tabela 6: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M1 dos casos MB e PB em comparação com os resultados de outras doenças infecciosas (DI), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95). ....67
- Tabela 7: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M2 medidos em valores de densidade óptica (DO) nos grupos casos multibacilares (MB), casos paucibacilares (PB), controles sem doenças conhecidas e pacientes com outras doenças infecciosas. ....67

Tabela 8: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M2 dos casos MB e PB em comparação com controles sem doenças conhecidas (CE), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95).....69

Tabela 9: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M2 dos casos MB e PB em comparação com os resultados de outras doenças infecciosas (DI), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95).....70

Tabela 10: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M1 medidos em valores de densidade óptica (DO) dos casos MB, casos PB, contatos intradomiciliares de caso índice MB e contatos intradomiciliares de caso índice PB.....71

Tabela 11: Positividade do ELISA anti-M1 nos 57 contatos intradomiciliares de casos PB e nos 61 contatos intradomiciliares de casos MB.....72

Tabela 12: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M2 medidos em valores de densidade óptica (DO) dos casos MB, casos PB, contatos intradomiciliares de caso índice MB e contatos intradomiciliares de caso índice PB.....72

Tabela 13: Positividade do ELISA anti-M2 nos 57 contatos intradomiciliares de casos PB e nos 61 contatos intradomiciliares de casos MB.....73



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1. INTRODUÇÃO .....	21
2.2. EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.3. CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA .....	23
2.4. DIAGNÓSTICO DA DOENÇA .....	25
2.4.1. <b>Diagnóstico clínico</b> .....	25
2.4.2. <b>Exame histopatológico</b> .....	25
2.4.3. <b>Baciloscopia</b> .....	26
2.4.4. <b>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	27
2.4.5. <b>Exames sorológicos</b> .....	27
2.4.5.1. PGL-1 nativo e antígenos semissintéticos .....	28
2.4.5.2. Proteínas recombinantes e proteína de fusão LID-1.....	30
2.4.5.3. Antígeno NDO-LID.....	31
2.4.5.4. Outras proteínas quiméricas e de fusão .....	33
2.4.5.5. Outras aplicabilidades dos exames sorológicos .....	35
2.4.6. <b>Proteômica</b> .....	38
2.4.7. <b>Genômica</b> .....	41
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	47
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>4. SUJEITOS DA PESQUISA, MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
4.1. PACIENTES .....	48
4.1.1. <b>Critérios de inclusão</b> .....	48
4.1.2. <b>Critérios de exclusão</b> .....	48
4.2. CONTROLES .....	48
4.3. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA.....	49

4.4.	AVALIAÇÃO DOS CONTATOS .....	51
4.5.	AMOSTRAS DE SORO .....	51
4.6.	CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS .....	52
4.7.	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ....	53
4.8.	ELISA PARA AVALIAÇÃO DAS QUIMERAS .....	54
4.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
4.10.	NORMAS ÉTICAS.....	55
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
5.1.	CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS .....	56
5.2.	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS ....	59
5.3.	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS QUIMERAS NO ELISA .....	62
5.3.1.	<b>Proteína quimérica M1 .....</b>	<b>63</b>
5.3.2.	<b>Proteína quimérica M2 .....</b>	<b>67</b>
5.4.	AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DOS CONTATOS .....	70
5.4.1.	<b>Proteína quimérica M1 .....</b>	<b>71</b>
5.4.2.	<b>Proteína quimérica M2 .....</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>8.</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>87</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>88</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>106</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa granulomatosa crônica da pele e nervos periféricos, causada pela bactéria intracelular obrigatória *Mycobacterium leprae*. O dano frequentemente observado nos nervos periféricos resulta em deficiências sensitivas e motoras, que podem causar incapacidades e deformidades físicas (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). O caráter incapacitante é o elemento que mais diferencia a hanseníase de outras doenças, devido às implicações físicas, psicológicas e sociais que constroem a participação do doente na sociedade (VAN BRAKEL, 2000).

A despeito da redução na incidência da hanseníase nas últimas décadas, a taxa de detecção de casos novos permanece elevada em algumas regiões, em especial na Índia, Indonésia e Brasil, que contribuíram com 78,1% dos casos novos no mundo em 2022. A redução mundial do número de casos novos com grau 2 de incapacidade (G2I) também foi lenta até 2019. Em 2022, após a pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19), observou-se aumento do número de tais casos em 12,8%. A detecção do G2I, definido pela presença de deformidades visíveis, reflete o atraso no diagnóstico da doença (WHO, 2023).

A hanseníase é uma doença polimórfica que apresenta diferentes formas clínicas, de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção (RIDLEY; JOPLING, 1966). A variabilidade das manifestações clínicas pode dificultar o reconhecimento da doença. Até o momento, o diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico e nenhum exame laboratorial é suficiente para diagnosticar a doença. Portanto, 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 físicas (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011; LASTORIA; ABREU, 2014; WHO, 2018; BRASIL, 2022).

Embora exista tratamento eficaz para a hanseníase, é importante ressaltar que o tratamento com poliquimioterapia (PQT) atinge com sucesso a esterilidade bacteriológica, mas apenas parcialmente reverte ou previne a perda de função neural (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; MARQUES *et al.*, 2008). Para que o tratamento com PQT seja eficaz na prevenção de incapacidades, ele deve ser instituído precocemente, de modo a interromper a evolução da doença antes do surgimento de neuropatia periférica (CROSS, 2007; BRASIL, 2022). Além disto, o

diagnóstico precoce e o tratamento oportuno favorecem a quebra da cadeia de transmissão do *M. leprae* (BRASIL, 2022). Percebe-se, assim, que constitui prioridade o desenvolvimento de teste laboratorial de fácil execução, baixo custo e que seja capaz de detectar as fases iniciais e oligossintomáticas da doença (LASTORIA; ABREU, 2014; WHO, 2018).

Testes sorológicos para detecção da infecção e para monitorar a resposta terapêutica são de grande interesse. Apesar de existirem alguns testes descritos para a hanseníase, nenhum deles é suficientemente específico e sensível para o diagnóstico da doença (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011; WHO, 2018). A Organização Mundial de Saúde (OMS) alerta que exames sorológicos já descritos, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de fluxo lateral, apresentam baixa sensibilidade para casos paucibacilares (PB), que são mais difíceis de diagnosticar clinicamente do que os casos multibacilares (MB) (WHO, 2018).

Com o intuito de melhorar o diagnóstico da hanseníase, grupos de pesquisa têm investindo em técnicas laboratoriais modernas e eficientes, como a proteômica e a genômica, para identificar antígenos promissores para o sorodiagnóstico da doença.

A aplicação de proteômica no estudo do *M. leprae* foi iniciado em 1996, em estudo que descreveu seis novas proteínas do bacilo (PESSOLANI; BRENNAN, 1996). Desde então, outros estudos têm buscado descrever novas proteínas do *M. leprae* utilizando, para isso, diferentes plataformas laboratoriais (PARKASH; SINGH, 2012). Esses estudos identificaram proteínas do *M. leprae*, das quais algumas não apresentam homólogos em *Mycobacterium tuberculosis*. Dentre as proteínas sem homologia nos bancos de dados disponíveis, podemos citar a ML0458, ML1553, ML0333, ML0369, ML0447, ML0959, ML0308, ML2346 e ML2347. Potencialmente, essas proteínas podem ser específicas do *M. leprae* e merecem estudos para avaliar seu potencial para o sorodiagnóstico da doença (MARQUES *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2008; WIKER; TOMAZELLA; SOUZA, 2011).

A sequência genômica completa do *M. leprae* foi descrita em 2001 (COLE *et al.*, 2001). Desde então, estudos de genômica e bioinformática têm sido desenvolvidos e descreveram proteínas potencialmente específicas do *M. leprae*, como a ML2567, ML0126, ML1057, ML0008, ML0308, ML2498, ML2028 e ML2038, que poderiam apresentar aplicação biológica (GELUK *et al.*, 2005; SPENCER *et al.*, 2005; ARAOZ *et al.*, 2006; SPENCER *et al.*, 2011).

As quimeras consistem na junção de diferentes fragmentos peptídicos, originando uma proteína artificialmente construída. Dessa maneira, proteínas quiméricas são capazes de expressar diferentes determinantes antigênicos, o que pode aumentar a sensibilidade de testes diagnósticos (AGUIRRE *et al.*, 2006; BOARINO *et al.*, 2005).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a antigenicidade de duas proteínas quiméricas que foram desenhadas a partir de proteínas específicas do *M. leprae*, e testar sua aplicabilidade no diagnóstico sorológico da hanseníase. As quimeras foram construídas por meio da predição de epítomos específicos para linfócitos B presentes em proteínas específicas do *M. leprae*, descritas em estudos de proteômica e genômica. A tecnologia apresentada trata do desenvolvimento e da avaliação de dois antígenos diagnósticos inéditos e seu uso no diagnóstico da hanseníase, e que poderiam ser disponibilizados para composição de *kit* laboratorial para detecção da doença.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença contagiosa causada pelo bacilo *M. leprae* (BRASIL, 1960). A principal fonte de infecção são indivíduos acometidos pela hanseníase, não tratados e com alta carga bacilar, que eliminam o *M. leprae* pelas vias aéreas superiores. Essa também é a via de entrada mais provável do bacilo no organismo. Para que a transmissão ocorra, é necessário contato domiciliar contínuo, o que é frequente na convivência no mesmo domicílio (BRASIL, 2022).

Embora uma segunda espécie de micobactéria, denominada *Mycobacterium lepromatosis*, tenha sido reconhecida como agente etiológico da hanseníase em 2008, o número de casos publicados relacionados a essa espécie ainda é pequeno. Ademais, os estudos ainda são escassos em relação à variabilidade clínica e à distribuição geográfica dessa nova espécie. São necessárias investigações adicionais que tragam informações sobre a real proporção desse patógeno entre os casos de hanseníase em países endêmicos e sobre seus possíveis impactos no diagnóstico (HAN, *et al.* 2008; DEPS; COLLIN, 2021).

### 2.2. EPIDEMIOLOGIA

As duas últimas décadas foram marcadas por conquistas no controle da hanseníase no âmbito mundial, o que pode ser atribuído a dois importantes eventos. O primeiro ocorreu em 1981, quando a OMS recomendou a PQT como tratamento padrão. A eficácia da PQT levou ao segundo marco, em 1991, quando a OMS adotou a meta de eliminar a hanseníase como problema de saúde pública até o final do ano 2000. Isso implicava atingir prevalência de menos de um caso para cada 10.000 pessoas. Dos 122 países considerados endêmicos em 1985, 107 atingiram a meta até o final de 2000, e 119 até 2010. O coeficiente de prevalência mundial sofreu queda de 90%, de 21,1 casos por 10.000 habitantes em 1985 para menos de um por 10.000 em 2000 (WHO, 2010). No Brasil, a taxa de prevalência apresentou redução de 30,4% nos últimos 10 anos. Contudo, não houve mudança no parâmetro de endemicidade, que permanece como médio, e a meta de eliminação da

hanseníase como problema de saúde pública ainda não foi alcançada. Em 2021, a taxa de prevalência no Brasil foi de 1,05 por 10 mil habitantes (BRASIL, 2023).

A despeito da redução substancial na prevalência da hanseníase nas últimas décadas, a taxa de detecção de casos novos não acompanhou essa marcante queda e permanece alta (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011). A hanseníase persiste como um desafio para a saúde pública, principalmente na Índia, Brasil e Indonésia, que contribuíram com 78,1% dos casos novos no mundo, em 2022. O declínio na taxa de detecção de casos novos no mundo entre 2013 e 2019 foi lento, com queda de 6% no período. A pandemia de COVID-19 resultou em redução de quase um terço na taxa de detecção entre 2019 e 2021. Posteriormente, houve novo aumento na detecção de casos novos mundialmente, o que pode ser atribuído à melhora na vigilância e no atendimento da hanseníase pós-pandemia. Em 2022, 174.087 casos novos foram notificados no mundo, o que representa aumento de 23,8% em comparação a 2021 (WHO, 2023). No Brasil, ocorreu dinâmica semelhante. Houve queda de aproximadamente 50% na taxa de detecção geral de casos novos em 10 anos, que passou de 17,17 em 2012 para 8,59 por 100 mil habitantes em 2021, com queda expressiva em 2020 e 2021 (BRASIL, 2023). Em 2022, o Brasil registrou aumento de 7,2% no número de novos casos notificados, que passou de 18.318, em 2021, para 19.635, em 2022 (WHO, 2023).

Com a importante queda da taxa de prevalência, a OMS adotou nova estratégia para controle da hanseníase, entre 2021 e 2030. Essa estratégia tem como objetivo a eliminação da doença definida pela interrupção da transmissão. Uma das metas propostas é a redução da taxa de detecção de casos novos com grau 2 de incapacidade (G2I) em 90% até 2030 (WHO, 2021a).

O G2I, definido pela presença de deformidades visíveis, reflete diretamente o atraso no diagnóstico da hanseníase. A redução do número de casos novos com G2I tem sido lenta no mundo, com tendências flutuantes entre 2011 e 2015. O número desses casos caiu de 13.079 em 2011 para 10.816 em 2019, um decréscimo de 17,3% no período. Em 2020, houve queda substancial na detecção de casos com G2I mundialmente em virtude da pandemia de COVID-19. (WHO, 2021b). Em 2022, o número de casos com G2I aumentou em 12,8%, passando de 8.469 em 2021 para 9.554 em 2022. No Brasil, foram diagnosticados 1917 casos com deformidades visíveis em 2022 (WHO, 2023). Quanto à proporção de casos novos com G2I no momento do diagnóstico, esta foi de 7,6% em 2012 e 11,2% em

2021, o que representa aumento de 47,9% e mudança no parâmetro de endemicidade no Brasil, que passou de médio para alto. Em 2022 foi registrado novo aumento, com essa proporção atingindo 11,6%, um importante indicador de diagnóstico tardio da hanseníase em território brasileiro (BRASIL, 2023).

### 2.3. CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA

A hanseníase é uma doença polimórfica que apresenta diferentes formas clínicas, de acordo com a resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro frente à infecção. Na década de 60, Ridley e Jopling propuseram uma classificação, para uso em pesquisa, que reflete o espectro de resistência do hospedeiro. A 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 virchowianos (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).

A hanseníase neural primária (NP), também conhecida como hanseníase neurítica, polineurítica ou neural pura, é uma forma clínica 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). Sua classificação sempre foi motivo de



controvérsia. A alta prevalência dessa forma clínica na Índia (5% até 17,7% dos casos) justificou a inclusão da forma NP como um grupo independente na classificação da Associação Indiana de Leprologistas (SEHGAL; JAIN; SRIVASTAVA, 1989; TALWAR; JHA; TIWARI, 1992). Ridley e Jopling não incluíram a forma NP como um grupo separado em sua classificação espectral. Os autores relataram que, embora a forma NP seja mais comum no TT, ela pode ocorrer em qualquer dos grupos, com exceção do VV (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Em 1981, a OMS preconizou a primeira classificação operacional para servir como base para a implementação da PQT. A hanseníase multibacilar (MB) incluía as formas VV, DV e DD da classificação de Ridley e Jopling, com índice baciloscópico (IB) maior ou igual a 2 em qualquer local. A hanseníase paucibacilar (PB) incluía as formas I, TT e DT, com IB < 2 em todos os locais (WHO, 1982). Durante o sexto encontro do Comitê de Especialistas em Hanseníase, em 1987, a classificação foi modificada de forma que todos os pacientes com baciloscopia positiva passaram a ser classificados como MB. Portanto, as formas I, TT e DT com baciloscopia negativa são consideradas PB. Já as formas VV, DV, DD e DT com baciloscopia positiva são classificadas como MB (WHO, 1988). Contudo, desde 1993, a OMS reconhecia que estratégias baseadas em critérios clínicos poderiam ser necessárias para a classificação operacional em localidades sem disponibilidade de exame baciloscópico de qualidade (WHO, 1998). Em 2000, a OMS adotou uma classificação operacional simplificada baseada apenas na contagem de lesões cutâneas, para fins de tratamento. Pacientes com até cinco lesões de pele são classificados como PB e aqueles com seis ou mais lesões cutâneas como MB (WHO, 2000).

No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) também adotou 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 por seis meses. Casos com mais de cinco lesões e/ou baciloscopia positiva são classificados como MB e devem receber PQT 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).

## 2.4. DIAGNÓSTICO DA DOENÇA

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

### 2.4.1. 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).

### 2.4.2. Exame histopatológico

O exame histopatológico de lesões cutâneas ou nervos, embora não seja considerado obrigatório pela OMS, constitui importante ferramenta para auxiliar no diagnóstico de casos clinicamente duvidosos, na classificação espectral de Ridley e Jopling e na confirmação de casos de recidiva (BRASIL, 2022).

As características histopatológicas das lesões cutâneas variam conforme a classificação da 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. Não se encontram bacilos. Os granulomas da forma DT são praticamente indistinguíveis dos da TT em sua composição. O melhor ponto de diferenciação é a presença de uma faixa subepidérmica preservada na forma DT. Bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) já podem ser encontrados, embora sejam escassos. Na forma DD, a característica essencial é a presença de células epitelióides difusamente espalhadas dentro do granuloma, sem o halo linfocitário circunjacente. Células gigantes multinucleadas estão ausentes e os bacilos são encontrados em quantidades moderadas. Na forma DV, o granuloma é composto por células histiocitárias e, em alguns casos, alterações espumosas podem ser vistas no citoplasma dos histiócitos.

Bacilos são observados em grandes quantidades. A forma VV é caracterizada por infiltração difusa de células histiocitárias com degeneração gordurosa do citoplasma, produzindo células espumosas repletas de BAAR, eventualmente formando globias. Já na forma I, a histopatologia é de pouca ajuda, pois geralmente os achados são indistinguíveis dos de dermatite crônica. Linfócitos e histiócitos são observados circundando anexos cutâneos e nervos. Por fim, os achados histopatológicos da biópsia de nervo são essencialmente os mesmos da biópsia cutânea (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A sensibilidade do exame histopatológico para hanseníase varia de 49 a 70%, de acordo com a forma clínica. Em 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%. A divergência em relação ao diagnóstico da forma I foi ainda mais expressiva, variando de 1,5 a 21,5%. Assim, o estudo sugere que o diagnóstico das formas iniciais da doença é difícil, mesmo para patologistas experientes (FINE *et al.*, 1986)

### **2.4.3. Baciloscopia**

A baciloscopia é o principal exame complementar disponível e utiliza, como material, o raspado intradérmico coletado em quatro sítios: lesão cutânea, lóbulos auriculares e cotovelo contralateral à lesão (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; BRASIL, 2010; LASTORIA; ABREU, 2014). O material de cada sítio é corado pelo método de Ziehl-Neelsen e examinado em objetiva de imersão. 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 baciloscopia apresenta alta especificidade, mas baixa sensibilidade, pois cerca de 70% dos pacientes com hanseníase apresentam resultados negativos (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). O exame é sempre negativo nos PB, o que absolutamente não exclui o diagnóstico. A baciloscopia, além de ser uma técnica invasiva, depende da habilidade e experiência dos profissionais que a executam e resultados negativos em paciente MB podem ocorrer por falhas na coleta, coloração e/ou leitura. A profundidade da incisão, a quantidade de material coletado, a espessura do esfregaço e a técnica de coloração podem influenciar no resultado do teste (BRASIL, 2010).

#### **2.4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

A sequência genômica completa do *M. leprae* foi descrita pela primeira vez em 2001 por Cole e colaboradores. O genoma do bacilo contém 3.268.203 pares de bases (3.27 MB) e revela um caso extremo de evolução reductiva. Menos da metade do pequeno genoma contém genes funcionais (49,5%). Ao todo, estão presentes 1.604 genes potencialmente ativos, dos quais 165 não apresentam ortólogos no *M. tuberculosis*. As proteínas produzidas por esses genes poderiam ajudar no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos para hanseníase (COLE *et al.*, 2001).

O sequenciamento do genoma do *M. leprae* permitiu a utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico da hanseníase. A PCR possibilita a detecção e quantificação do bacilo, com resultados superiores em comparação ao exame baciloscópico. De modo geral, a avaliação do PCR em diferentes estudos mostrou sensibilidade de 34 a 80% em pacientes PB e acima de 90% em pacientes MB. A PCR é especialmente útil em casos de difícil diagnóstico, como formas iniciais de hanseníase PB e hanseníase neural primária (MARTINEZ *et al.*, 2014). Entretanto, é restrita aos centros de pesquisa devido ao custo elevado e necessidade de equipamentos específicos e profissionais habilitados (LASTORIA; ABREU, 2014). Portanto, ensaios de PCR que utilizam material de biópsia, embora apresentem maior especificidade e sensibilidade que exames sorológicos, são de difícil implementação em campo, não apresentam padronização e não estão disponíveis comercialmente. Além disso, ensaios de PCR utilizando amostras biológicas como sangue e urina são menos invasivos, mas apresentam baixa sensibilidade (WHO, 2018).

#### **2.4.5. Exames sorológicos**

Testes sorológicos para detecção da infecção e monitoramento da resposta terapêutica são de grande interesse. Apesar de existirem alguns testes descritos, nenhum deles é suficientemente específico e sensível para o diagnóstico de hanseníase (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011; WHO, 2018). A OMS alerta que exames sorológicos já descritos, como o ELISA e o teste de fluxo lateral,

apresentam baixa sensibilidade para casos PB, que são mais difíceis de diagnosticar clinicamente do que os MB. Portanto, considerando a evidência disponível até o momento, exames laboratoriais não apresentam vantagens claras sobre as ferramentas diagnósticas convencionais (exame clínico, acompanhado ou não de baciloscopia e biópsia). Estudos para desenvolvimento de testes diagnósticos de maior acurácia em hanseníase são considerados pela OMS como uma das prioridades na pesquisa da doença (WHO, 2018).

#### 2.4.5.1. PGL-1 nativo e antígenos semissintéticos

Até o momento, os testes sorológicos melhor padronizados utilizam o antígeno glicolípido fenólico 1 (PGL-1). O PGL-1 foi descrito em 1980 e é o principal glicolípido antigênico do *M. leprae* (BRENNAN; BARROW, 1980; HUNTER; BRENNAN, 1981), sendo capaz de desencadear resposta humoral específica, com produção predominante de IgM (YOUNG *et al.*, 1984).

A molécula de PGL-1 possui um trissacarídeo antigenicamente específico do *M. leprae* (3,6-di-O-metila-glicopiranosil-(1→4)-2,3-di-O-metila-ramnopiranosil-(1→2)-3-O-metila-ramnopiranosose) ligado glicosidicamente ao fenol (HUNTER; FUJIWARA; BRENNAN, 1982). O principal determinante antigênico do PGL-1 é a parte di e trissacarídica final da molécula; já a longa cadeia de ácidos graxos não tem ação importante na ligação de anticorpos. A parte terminal 3,6-di-O-metila-glicopiranosil é a responsável pela maior atividade antigênica, com pequena contribuição do penúltimo açúcar 2,3-di-O-metil-ramnopiranosil. Esses achados sugerem que a síntese da parte dissacarídica final da molécula poderia fornecer um antígeno sintético específico para utilização no diagnóstico sorológico da hanseníase (FUJIWARA *et al.*, 1984).

O PGL-1 foi primeiramente utilizado em estudos sorológicos em 1982 (PAYNE; DRAPPER; REES, 1982). Pode ser utilizado por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), testes de hemaglutinação, *dipstick* e teste rápido de fluxo lateral (ML *Flow*) (MOURA *et al.*, 2008). Metanálise que avaliou a acurácia do ELISA na detecção de anticorpos contra PGL-1 nativo demonstrou sensibilidade combinada de 78% (60-90 IC 95%) em pacientes MB e de 34% (11-67 IC 95%) em pacientes PB. A especificidade foi de 99% no grupo MB e de 97% no grupo PB (ESPINOSA *et al.*, 2018). O ML *dipstick* é um teste qualitativo simples e rápido que detecta

anticorpos IgM contra PGL-1, com elevada concordância com os resultados do ELISA (97,2%). Pode ser aplicado em campo, não requer equipamentos especiais ou refrigeração e os resultados ficam disponíveis em uma hora (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 1998). O ML *Flow* também é um teste rápido para uso em campo, que demonstra os resultados em 10 minutos e apresenta 91% de concordância com o método ELISA. Os resultados podem ser registrados de forma qualitativa (positivo ou negativo) ou semiquantitativa (negativo, 1+, 2+, 3+ ou 4+) (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003).

A parte di- e trissacarídica final da molécula de PGL-1 pode ser sintetizada e, para que se ligue às placas de ELISA, precisa ser ligada a proteínas carreadoras, como a albumina sérica bovina (BSA) ou albumina sérica humana (HSA), de forma direta ou utilizando ligantes, como o radical octil (O) ou fenol (P) (FUJIWARA; IZUMI, 1987). Dessa forma, os seguintes antígenos semissintéticos já foram sintetizados: dissacarídeo-BSA (D-BSA) (FUJIWARA *et al.*, 1984), trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA) (FUJIWARA; IZUMI, 1987), dissacarídeo natural-octil-BSA (ND-O-BSA) e dissacarídeo natural-octil-HSA (ND-O-HSA) (CHATTERJEE *et al.*, 1986). Os antígenos semissintéticos podem ser produzidos em maior escala e aplicados mais facilmente que o PGL-1 nativo, o que viabilizou estudos sorológicos em escala maior (FUJIWARA *et al.*, 1984).

O dissacarídeo terminal conjugado à albumina bovina (D-BSA) apresentou desempenho semelhante ao PGL-1 nativo no ELISA (FUJIWARA *et al.*, 1984). O NT-P-BSA apresentou maior sensibilidade e especificidade do que o dissacarídeo ND-P-BSA no método ELISA. A soropositividade do NT-P-BSA e do ND-P-BSA foi, respectivamente, de 78 e 65% em pacientes com MHV e de 30 e 20% em pacientes com MHT (FUJIWARA; IZUMI, 1987). O ML *dipstick* utilizando ND-O-BSA como antígeno apresenta 77% de sensibilidade para detectar casos MB, ao passo que apenas 7,5% dos pacientes PB apresentam anticorpos anti PGL-1 detectáveis pelo ML *dipstick* (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2000). O ML *Flow* utilizando NT-P-BSA como antígeno apresenta soropositividade em 97,4% dos pacientes MB e em 40% dos pacientes PB (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003). Embora sejam úteis na classificação dos pacientes, ambos os testes rápidos não são boas ferramentas diagnósticas, uma vez que a maioria dos pacientes PB não desenvolve anticorpos em níveis detectáveis (BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2000; 2003).

Estudo de metanálise que avaliou a acurácia do ELISA na detecção de anticorpos contra ND-O-BSA demonstrou sensibilidade combinada de 94% (78-98 IC 95%) em pacientes MB e de 56% (27-81 IC 95%) em pacientes PB e especificidade de 99% em ambos os grupos. Os resultados foram superiores aos encontrados em estudos com PGL-1 nativo (ESPINOSA *et al.*, 2018).

Em estudo sorológico comparativo realizado em Minas Gerais, o ELISA utilizando PGL-1 nativo como antígeno teve sensibilidade e acurácia diagnóstica superior à do ELISA utilizando ND-O-HSA e do ML-Flow com NT-P-BSA. A sensibilidade geral do PGL-1 nativo, ND-O-HSA e do ML *Flow* foi de, respectivamente, 68,83%, 63,84% e 60,65%, com especificidade de 98% em ambos os ensaios de ELISA. Quando a análise separou os pacientes de acordo com a classificação operacional, observou-se importante redução de sensibilidade no grupo PB para todos os antígenos estudados. A positividade do ELISA com PGL-1 foi de 22,73% e de 31,82% com ND-O-HSA. ML *Flow* não foi capaz de detectar anticorpos nos pacientes PB (LOBATO *et al.*, 2011).

A presença de anticorpos anti-PGL-1 reflete a carga bacilar, com títulos elevados em pacientes MB e baixos ou ausentes em pacientes PB (FUJIWARA; IZUMI, 1987; BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; LOBATO *et al.*, 2011). Revisão sistemática mostrou que a média de soropositividade entre diferentes estudos utilizando o PGL-1 é de 78% nos pacientes MB, variando de 51,2 a 97,4%, e de 23% nos pacientes PB, com variações de 6,9 até 57,3% (MOURA *et al.*, 2008).

Portanto, embora testes anti-PGL1 sejam úteis na classificação dos pacientes, monitoramento da terapia e seleção de contatos com maior risco de adoecer, apresentam valor diagnóstico limitado nos PB, exatamente as formas de mais difícil diagnóstico, devido à baciloscopia negativa. Além disso, nas áreas endêmicas, a soropositividade pode ser encontrada em contatos e não contatos de hanseníase, e não há um ponto de corte que permita diferenciar com segurança a infecção subclínica da doença, limitando ainda mais o uso do PGL-1 como teste diagnóstico (MOURA *et al.*, 2008).

#### 2.4.5.2. Proteínas recombinantes e proteína de fusão LID-1

Na era pós-genômica, testes sorológicos capazes de detectar anticorpos da classe IgG contra proteínas nativas ou recombinantes do *M. leprae* foram

desenvolvidos e testados em diferentes populações ao redor do mundo. Em estudo realizado na Índia, ELISA utilizando a proteína ML0411 como antígeno apresentou sensibilidade de 100% para diagnóstico de Hanseníase MB e de 47% para PB (PARKASH *et al.*, 2006). Já em outro estudo indiano que avaliou o desempenho da proteína ML0049 em plataforma de ELISA, a sensibilidade foi de 82,4% para detecção de casos MB e de 19,4% para PB (PARKASH *et al.*, 2007).

Em 2006, estudo em pequena escala demonstrou que as proteínas ML0405 e ML2331 eram reconhecidas em soros de pacientes MB com alto IB (REECE *et al.*, 2006). Em 2007, estudo com maior número de pacientes forneceu evidências adicionais de que essas proteínas apresentam potencial para aplicação no diagnóstico sorológico da Hanseníase, sendo capazes de detectar casos MB, independentemente da origem geográfica, e parte dos casos PB. Baseado nisso, uma proteína de fusão composta por ML 0405 e ML2331 foi desenvolvida e denominada *leprosy Infectious Disease Research Institute (IDRI) diagnostic-1 (LID-1)* (DUTHIE *et al.*, 2007).

A sensibilidade do ELISA em detectar anticorpos IgG contra a proteína de fusão LID-1 em pacientes MB é consistentemente alta em diferentes populações (DUTHIE *et al.*, 2007; HUNGRIA *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2013; FABRI *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2016, AMORIM *et al.*, 2016). Para o diagnóstico de casos PB, a sensibilidade é menor e variável em diferentes regiões geográficas. Em estudos realizados no Brasil, a positividade do ELISA em casos PB variou de 7% no Estado do Mato Grosso, 10,5% em Uberlândia, Minas Gerais, 7% nos Estados de Goiás e Ceará, chegando a 16% no Rio Grande do Norte (HUNGRIA *et al.*, 2012; FABRI *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2016; AMORIM *et al.*, 2016). Já em estudo no Japão, a sensibilidade do ELISA em detectar anticorpos anti-LID-1 foi de 20% (DUTHIE *et al.*, 2007). Estudos chineses mostraram resultados mais favoráveis em pacientes PB, com sensibilidade de 53,33% em um estudo e de 36,4% em outro (WEN *et al.*, 2013; WEN *et al.*, 2014). Metanálise que avaliou a acurácia do ELISA na detecção de anticorpos contra LID-1 demonstrou sensibilidade combinada de 79% (66-88 IC 95%) em pacientes MB e de 20% (7-46 IC 95%) em pacientes PB e especificidade de 97% em ambos os grupos (ESPINOSA *et al.*, 2018).

#### 2.4.5.3. Antígeno NDO-LID



Outro antígeno amplamente estudado no diagnóstico sorológico da hanseníase é o NDO-LID, que é a combinação de dois antígenos previamente caracterizados, LID-1 e ND-O, em um único complexo de fusão. O complexo NDO-LID retém a capacidade dos antígenos individuais em detectar anticorpos, sendo capaz de se ligar aos anticorpos das classes IgM e IgG, de forma a aumentar a sensibilidade diagnóstica de testes ELISA (DUTHIE *et al.*, 2014a). Em estudo realizado na Colômbia, o teste ELISA apresentou sensibilidade de 78% em detectar anticorpos IgM contra o dissacarídeo presente no NDO-LID e de 81,6% em detectar anticorpos IgG contra o componente proteico do complexo. Quando a detecção simultânea de IgG e IgM foi avaliada, a sensibilidade do exame subiu para 86,3% (MUÑOZ *et al.*, 2018).

A sensibilidade de testes sorológicos em detectar anticorpos contra NDO-LID em casos MB é elevada, porém variável conforme a população avaliada e o tipo de teste. A sensibilidade do ELISA foi de 90,6% em estudo na Colômbia e nas Filipinas, 71,7% em Minas Gerais e de 95% no Rio Grande do Norte, Brasil (DUTHIE *et al.*, 2014a; FABRI *et al.*, 2015; AMORIM *et al.*, 2016). Já a acurácia diagnóstica para casos PB é bem inferior, em especial em áreas endêmicas, onde há maior probabilidade de haver indivíduos infectados incluídos inadvertidamente no grupo controle. Estudo com casos de hanseníase e controles saudáveis residentes em áreas endêmicas da Colômbia e das Filipinas mostrou que a sensibilidade do ELISA em detectar anticorpos contra NDO-LID foi de 27% em casos PB (DUTHIE *et al.*, 2014a). Já em estudos semelhantes realizados no Brasil, a sensibilidade do ELISA foi de 28,3% em Minas Gerais e de apenas 6% em áreas hiperendêmicas do Rio Grande do Norte (FABRI *et al.*, 2015; AMORIM *et al.*, 2016).

Em estudo realizado em Governador Valadares, não houve diferença significativa na acurácia do ELISA utilizando os antígenos LID-1 (sensibilidade 63,2%, especificidade 92,5%, AUC 0,751) e NDO-LID (sensibilidade de 57,9%, especificidade de 97,5%, AUC 0,763) para diagnóstico das formas MB e PB de hanseníase. Contudo, a sensibilidade dos exames sorológicos foi superior à do PCR quantitativo do raspado intradérmico dos lóbulos das orelhas (36,8%) e da baciloscopia em quatro sítios (30,2%) (GAMA *et al.*, 2018).

O antígeno NDO-LID também pode ser utilizado em imunocromatografia de fluxo lateral, possibilitando diagnóstico sorológico em 10 a 20 minutos (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014b). Quando a imunocromatografia foi utilizada, a

sensibilidade do NDO-LID em detectar casos MB foi de 87 % em Goiás e nas Filipinas, 95% na China e de 73,6% no estado do Amazonas, Brasil (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014b; WEN *et al.*, 2014; LETURIONDO *et al.*, 2019).

De forma análoga ao que ocorre com o ELISA, a imunocromatografia apresenta menor sensibilidade para detecção de casos PB. Teste imunocromatográfico rápido NDO-LID apresentou, respectivamente, sensibilidade e especificidade de 32,3% e 97,4% em pacientes PB das Filipinas e de 34% e 81,7% em pacientes PB provenientes do Estado do Amazonas (DUTHIE *et al.*, 2014b; LETURIONDO *et al.*, 2019). No Estado de Goiás, o teste rápido NDO-LID apresentou taxa de positividade de 21,2% em pacientes PB, resultado superior ao do ensaio de ELISA com PGL-1 (15,4% de amostras positivas) (CARDOSO *et al.*, 2013). Em estudo realizado na China com 11 pacientes PB, o teste rápido apresentou desempenho superior ao do ELISA com NDO-BSA, LID-1 ou NDO-LID, para detecção de casos PB, com sensibilidade de 63,7% (WEN *et al.*, 2014). Ressalta-se, contudo, o pequeno número de pacientes incluídos nesse estudo em comparação aos estudos com amostras maiores desenvolvidos no Brasil e nas Filipinas.

#### 2.4.5.4. Outras proteínas quiméricas e de fusão

Embora testes sorológicos tenham capacidade limitada para diagnosticar casos PB; diversos estudos mostraram que a fusão de antígenos pode aumentar a sensibilidade dos testes (DUTHIE *et al.*, 2007; DUTHIE *et al.*, 2014a; DUTHIE *et al.*, 2014b; FABRI *et al.*, 2015; JIAN *et al.*, 2020).

No Japão, a positividade do ELISA em casos PB foi de 13% tanto para as proteínas ML0405 e quanto para ML2331. Quando se utiliza a proteína de fusão LID-1 no ensaio, a positividade do teste aumentou para 20% (DUTHIE *et al.*, 2007). Estudo nas Filipinas mostrou que maior proporção de pacientes PB apresenta anticorpos detectáveis contra o complexo NDO-LID (45%) do que contra NDO-HSA (36,4%) ou LID-1 (21,2%), separadamente (DUTHIE *et al.*, 2014a). Resultado semelhante foi encontrado em Minas Gerais, onde estudo comparativo demonstrou que a positividade do ELISA em casos PB foi de 28,3% com o antígeno NDO-LID, 23,3% com NDO-HSA e 10,5% com LID-1 (FABRI *et al.*, 2015). O teste rápido NDO-LID também apresentou maior sensibilidade do que o teste rápido NDO-BSA. A

positividade em casos MB e PB, respectivamente, foi de 81,7% e 6,5% para o antígeno NDO-BSA e de 87% e 32,3% para o NDO-LID (DUTHIE *et al.*, 2014b). Análise por curva ROC dos resultados da sorologia de 113 casos de hanseníase mostrou que a eficácia diagnóstica do NDO-LID foi superior à observada com os antígenos NDO-BSA e LID-1, tanto para casos PB quanto para MB (JIAN *et al.*, 2020).

Dessa forma, outros antígenos de fusão, além da LID-1 e do NDO-LID, já foram desenvolvidos e avaliados em testes sorológicos. Em estudo com pacientes do Nepal e das Filipinas, 144 proteínas do *M. leprae* foram avaliadas quanto ao seu potencial para diagnóstico da hanseníase. As proteínas que apresentaram maior poder de diferenciar soros provenientes de pacientes MB de soros de indivíduos saudáveis moradores de área endêmica foram: ML0405, ML2331, antígeno de fusão ML0050-0049, ML2055, ML0091 e ML0411. Tal estudo, além de confirmar os antígenos ML0405 e ML2331 como marcadores robustos de infecção MB, apontam outros candidatos para sorodiagnóstico da hanseníase (DUTHIE *et al.*, 2008). Posteriormente, epítomos reativos presentes nas proteínas ML0405, ML2331, ML2055, ML0411 e ML0091 foram usados para construir uma proteína quimérica multiepitópica denominada PADL (*protein advances diagnostic of leprosy*) (DUTHIE *et al.*, 2010).

Para avaliar a acurácia da PADL no diagnóstico da hanseníase, amostras de soro de pacientes PB, MB e de controles de área endêmica, provenientes das Filipinas, foram testados em ensaios de ELISA. Foi detectada positividade em 16 das 20 amostras de soro de casos MB e em apenas uma das 15 amostras de casos PB (DUTHIE *et al.*, 2010). Em estudo populacional realizado no Estado da Paraíba, Brasil, 1620 indivíduos moradores da área hiperendêmica de Cajazeiras foram selecionados aleatoriamente para avaliação sorológica com ELISA anti-PADL. O exame foi positivo em 31,8% da amostra. Dos 1620 indivíduos testados, 556 foram submetidos a exame dermatoneurológico (349 soropositivos e 209 soronegativos) e 15 receberam o diagnóstico clínico de hanseníase (13 PB e 2 MB). O ELISA foi positivo em 13 dos 15 pacientes (11 PB e 2 MB). Dessa forma, a sensibilidade do PADL em detectar hanseníase foi de 86,7%, a especificidade foi de 38% e o valor preditivo positivo foi de apenas 3,7%. A baixa especificidade em áreas endêmicas pode ser explicada pela alta exposição ao *M. leprae* e pela presença de infecção assintomática na comunidade (SOUZA *et al.*, 2014).

Duas outras proteínas de fusão foram testadas em estudo realizado no Brasil. A proteína 46f é produzida por meio da fusão entre ML0568 e ML0405 e a 92f é composta por ML2028, ML2346 e ML1862. O ELISA foi capaz de detectar anticorpos IgG contra a proteína 46f em 86,6% dos pacientes MB e em 33,3% dos PB. Em relação à 92f, a soropositividade foi de 64,4% em casos MB e de 22,2% em casos PB (HUNGRIA *et al.*, 2012)

#### 2.4.5.5. Outras aplicabilidades dos exames sorológicos

Embora a sorologia não apresente sensibilidade suficiente para ser usada como ferramenta diagnóstica isolada, principalmente para casos PB, ela pode ter outras aplicabilidades na hanseníase.

A soropositividade entre contatos assintomáticos de pacientes de hanseníase indica que o bacilo entrou na circulação a partir do sítio de infecção, o que evidencia infecção subclínica (ARAUJO *et al.*, 2012; ARAUJO *et al.*, 2016; FRADE *et al.*, 2017). A proporção de contatos intradomiciliares com sorologia positiva para hanseníase varia em diferentes estudos. Em Minas Gerais, as taxas de soropositividade dos contatos de casos MB e PB foram, respectivamente, 43,2 e 26,1% para o antígeno LID-1; 38,3 e 26,1% para NDO-LID; 12,3 e 0% para NDO-HSA e 17,3 e 4,3% para PGL-1 (FABRI *et al.*, 2015). Em outro estudo conduzido em Minas Gerais com 1.352 contatos, a positividade do ELISA anti-PGL-1 foi de 11,5% em contatos de caso índice PB e de 13,8% em contatos de pacientes MB (ARAUJO *et al.*, 2012). Na China, a avaliação de 96 contatos de casos MB por meio do ELISA mostrou soropositividade de 30,21% com NDO-BSA e de 6,25% com LID-1 (WEN *et al.*, 2013). O teste rápido com NDO-LID apresentou positividade em apenas 3,9% dos contactantes de pacientes MB (DUTHIE *et al.*, 2014b).

Estudos também mostraram presença de infecção subclínica em indivíduos que desconhecem contato com pacientes com hanseníase (GOULART *et al.*, 2015; FRADE *et al.*, 2017). Estudo conduzido em Minas Gerais avaliou a presença de infecção subclínica em doadores de sangue sem história de contato com hanseníase e sem sinais e ou sintomas da doença. Dos 1007 doadores avaliados, 38 apresentaram ELISA anti-PGL-1 positivo e 3 apresentaram DNA do bacilo detectável por PCR. Os 41 doadores com exames positivos foram acompanhados por cinco anos e seis adoeceram no período (GOULART *et al.*, 2015). Estudo com voluntários

recrutados durante campanha diagnóstica no Distrito Federal do Brasil avaliou a positividade de três testes sorológicos em 338 indivíduos sem sinais clínicos de hanseníase. As taxas de positividade nos contatos (52% em teste rápido com NDO-LID, 30% no ELISA anti-PGL-1 e 24% no ELISA anti-LID-1) foram semelhantes às taxas encontradas em indivíduos sem história de contato (60% em teste rápido com NDO-LID, 34% no ELISA anti-PGL-1 e 27% no ELISA anti-LID-1). O estudo mostrou elevada taxa de infecção subclínica entre indivíduos sem sinais ou sintomas de hanseníase, o que indica alta taxa de exposição ao bacilo na região, mesmo em pessoas que desconhecem contato com portadores da doença (FRADE *et al.*, 2017).

A sorologia pode ser usada para monitorização dos contatos e seleção daqueles com maior risco de adoecimento. Estudo prospectivo conduzido nas Filipinas que acompanhou 559 contatos intradomiciliares de casos MB, entre 1985 e 1991, mostrou que contatos com sorologia PGL-1 positiva apresentam maior risco de adoecimento. 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 aumentou o risco de adoecimento em seis vezes (RR= 5,68) (ARAUJO *et al.*, 2015). Esses achados foram corroborados por estudo que avaliou contatos domiciliares de hanseníase por meio de PCR da mucosa nasal e do sangue periférico e por ELISA anti-PGL-1. Dos 104 contatos avaliados, 18,3% eram soropositivos ao ELISA e 6,7% desenvolveram hanseníase após um período de seguimento de 5 a 7 anos. A positividade do PCR da mucosa nasal não aumentou o risco de adoecimento. Já a soropositividade ao ELISA aumentou o risco de desenvolvimento de hanseníase em seis vezes (RR = 5,97) (ARAUJO *et al.*, 2016).

Existem evidências de que a sorologia utilizando antígenos proteicos também pode ser usada para monitorização de contatos, com o objetivo de proporcionar diagnóstico mais precoce. Quando amostras de soros provenientes de 559 contatos de casos MB das Filipinas foram avaliadas quanto à presença de anticorpos contra

LID-1, observou-se que os títulos do ELISA começam a aumentar até um ano antes do diagnóstico clínico de hanseníase. Em 64% dos contatos que adoeceram, a elevação dos títulos de IgG anti-LID-1 foi mais marcante do que a elevação dos níveis de IgM anti-PGL-1. A diferença nos títulos de anticorpos entre os contatos que adoeceram e os que permaneceram saudáveis também foi mais evidente com LID-1 do que com PGL-1 (DUTHIE *et al.*, 2007). Estudo prospectivo realizado na China também mostrou que a elevação dos títulos de anticorpos anti-PGL-1 e anti-LID-1 pode ser um prenúncio do desenvolvimento de hanseníase em contatos (QIONG-HUA *et al.*, 2013). Outro estudo acompanhou 332 contatos domiciliares moradores de município hiperendêmico do Estado do Rio Grande do Norte por sete anos. Dentre eles, 12 (3,6%) desenvolveram hanseníase no período de acompanhamento. A taxa de positividade inicial do ELISA anti-LID-1 e anti-NDO-LID dos contatos que adoeceram foi aproximadamente o dobro da taxa dos contatos que não adoeceram. A média de densidade óptica também foi significativamente maior entre os contatos que desenvolveram hanseníase (AMORIM *et al.*, 2016). Portanto, contatos com sorologia positiva devem ser monitorados de forma mais frequente.

A sorologia com proteínas recombinantes também tem potencial para ser usada na monitorização da eficácia do tratamento e como marcadora de risco de recorrência da hanseníase. Estudo longitudinal mostrou que os títulos do ELISA para três antígenos proteicos testados (LID-1, ML0405 e ML2331) começam a declinar poucos meses após o início da PQT. Esse declínio ocorreu de forma mais rápida do que a queda dos títulos anti-PGL-1, o que sugere que a sorologia com antígenos proteicos pode ser utilizada na monitorização da eficácia terapêutica. Além disso, a maioria dos pacientes não apresentou anticorpos circulantes contra as três proteínas avaliadas dez anos após o tratamento, indicando que os anticorpos não são persistentes e que não interferem no diagnóstico de recidiva ou reinfecção (DUTHIE *et al.*, 2011). Estudo realizado na Venezuela apresentou resultados semelhantes. Houve redução dos títulos de IgG contra as proteínas ML0405, ML2331 e LID-1, tanto em pacientes MB quanto em PB após a PQT (RADA *et al.*, 2012).

Conforme exposto, de forma análoga à sorologia anti-PGL-1, a presença de anticorpos IgG que reagem contra antígenos proteicos reflete o espectro da hanseníase e a carga bacilar, com a maioria dos pacientes MB apresentando altos títulos e poucos pacientes PB responsivos (HUNGRIA *et al.*, 2012). Portanto, a busca por um teste sorológico de fácil aplicação e elevada acurácia para o

diagnóstico da hanseníase permanece como prioridade (WHO, 2018; BRASIL, 2022).

#### 2.4.6. Proteômica

Com o intuito de desenvolver novas ferramentas diagnósticas, diversos grupos de pesquisa continuam investindo em técnicas laboratoriais modernas e eficientes, como a proteômica e a genômica, para identificação de antígenos promissores para sorodiagnóstico da hanseníase.

Proteômica é o estudo do conjunto completo de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo, em um dado período de tempo e em condições definidas (PARKASH; SINGH, 2012). Enquanto estudos de genômica permitem avaliar a expressão de um grande número de genes, proteômicas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre o conjunto de proteínas expressas. Assim, estudos de proteômica oferecem uma visão global de todas as proteínas expressas pelo genoma. Notavelmente, proteômicas avaliam características biológicas que não podem ser identificadas por análise do DNA, como abundância relativa de uma determinada proteína, modificações pós-translacionais, localização subcelular das proteínas (parede celular, membrana citoplasmática e citosol) e a interação entre as proteínas (JAMES, 1997).

Estudos anteriores à aplicação de técnicas modernas de proteômicas já haviam identificado aproximadamente 37 proteínas. Esses estudos empregam metodologias diversas, como bioquímica clássica, tecnologia de DNA recombinante, uso de anticorpos monoclonais em soros de pacientes, e resultaram na identificação das principais proteínas nativas do *M. leprae* (MARQUES *et al.*, 2004). Estudo pioneiro identificou genes que codificam cinco proteínas imunogênicas, com pesos moleculares de 65, 36, 28, 18 e 12 kDa (YOUNG *et al.*, 1985). Estudo posterior identificou que duas dessas proteínas pertenciam à família das proteínas do choque térmico, sendo que a proteína de 65 kDa apresenta homologia com a GroEL da *Escherichia coli* e a de 18 kDa com uma proteína presente na soja. Esse estudo também descreveu uma proteína de 70 kDa homóloga à proteína do choque térmico Dna-K (YOUNG *et al.*, 1988). Posteriormente, a proteína do choque térmico de 10 kDa análoga da GroEs foi descrita e considerada a proteína mais abundante do *M. leprae*, representando aproximadamente 1% da massa da bactéria (RIVOIRE *et al.*,

1994). Estudo com metodologia bioquímica clássica resultou na caracterização das proteínas principais da membrana, denominadas MMP-1 (*major membrane protein-1*) e MMP-2 (*major membrane protein-2*) (HUNTER *et al.*, 1990).

A aplicação de proteômicas no estudo do *M. leprae* foi iniciado 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).

Estudo inicial com abordagem proteômica analisou o extrato de *M. leprae* derivado de fígado e baço de tatus infectados, além da fração citosólica solúvel. As proteínas foram separadas por eletroforese uni ou bidimensional e, posteriormente, submetidas ao sequenciamento de Edman. Seis novas proteínas foram identificadas, das quais três não apresentavam homologia significativa nos bancos de dados Genbank e Swissprot (PESSOLANI, BRENNAN, 1996). Posteriormente, outro estudo analisou as três frações subcelulares do bacilo por meio de eletroforese bidimensional e sequenciamento de Edman. Foram identificadas oito proteínas presentes na parede celular do bacilo, das quais duas não apresentavam homólogos nos bancos de dados Genbank e Swissprot (MARQUES *et al.*, 1998).

Estudos posteriores empregando técnicas mais avançadas de proteômica identificaram diversas outras proteínas do *M. leprae*, algumas das quais não apresentam homólogos em *M. tuberculosis*. Potencialmente, essas proteínas poderiam ser específicas do *M. leprae* e mereceriam estudos adicionais para avaliar seu potencial para imunodiagnóstico (MARQUES *et al.*, 2004; MARQUES *et al.*, 2008; WIKER; TOMAZELLA; SOUZA, 2011).

Análise proteômica mais moderna, empregando eletroforese bidimensional e espectrometria de massa, avaliou duas frações subcelulares do bacilo, membrana



celular e citosol. O estudo permitiu a identificação de 46 proteínas (algumas previamente descritas), correspondendo a 2,87% do produto genético predito. Vinte e nove das 46 proteínas eram novas proteínas. Em relação à localização subcelular, 12 novas proteínas foram identificadas na fração de membrana, 13 na fração citosólica solúvel e quatro estavam presentes em ambas as frações. A proteína citosólica ML0458 (oxidoreductase hipotética) era a única que não apresentava homologia em *M. tuberculosis* (MARQUES *et al.*, 2004).

Análise proteômica de alto desempenho, por meio de múltiplas plataformas de separação seguida de espectrometria de massa, permitiu a identificação de 218 novas proteínas do *M. leprae*. Dessa forma, o estudo aumentou o número de proteínas conhecidas até então de 66 para 284, o que corresponde a 17,6% da produção gênica predita pela sequência genômica. Dentre as novas proteínas identificadas, 60 estavam presentes na fração citosólica, 98 na membrana e 104 na parede celular. Embora algumas proteínas estivessem presentes em mais de um compartimento subcelular, a maioria era exclusiva de apenas uma das frações. Cinco das proteínas identificadas são potencialmente específicas do *M. leprae*, enquanto as restantes apresentam homólogos no *M. tuberculosis*. Destas, quatro estão presentes no envelope celular (apenas na parede ou na parede e membrana simultaneamente): ML0369 (proteína hipotética conservada), ML0447 (proteína hipotética conservada), ML0959 (proteína hipotética) e ML1553 (prolyl tRNA sintetase). Já a ML0333, também uma proteína hipotética conservada, está presente na fração citosólica (MARQUES *et al.*, 2008).

Em um amplo estudo, o extrato total de proteínas do *M. leprae* foi analisado por meio de espectrometria de massa utilizando o LTQ-Orbitrap (*hybrid linear ion trap*), uma ferramenta nova e de alto desempenho para análise espectrométrica. O estudo identificou 1046 proteínas, o que corresponde a 65,3% do proteoma predito. (SOUZA *et al.*, 2009). Nesse estudo, os aspectos quantitativos não foram considerados. O potencial antigênico e a caracterização das proteínas identificadas também não foram avaliados. Posteriormente, Wiker e colaboradores analisaram novamente os dados, desta vez quantitativamente por meio do MaxQuant (*software* para análise proteômica quantitativa). Com essa nova abordagem, as 20 proteínas mais abundantes foram descritas. Como era de se esperar, as proteínas mais estudadas e melhor caracterizadas em estudos prévios estão entre as mais abundantes. No topo da lista estão duas proteínas do choque térmico, GroEL2

(ML0317) seguida da GroES (ML0380). A terceira proteína mais abundante é a MMP-1 (*major membrane protein 1*, ML0841) e a quarta é a proteína do choque térmico DnaK de 70 Kda (ML2496) (WIKER; TOMAZELLA; SOUZA, 2011). Todas as quatro proteínas mais abundantes já haviam sido descritas em estudos prévios (YOUNG *et al.*, 1988; HUNTER *et al.*, 1990; RIVOIRE *et al.*, 1994).

O estudo de Wiker e colaboradores (2011) também avaliou a presença de proteínas restritas ao *M. leprae* dentre o total de proteínas identificadas pela espectrometria de massa. De um total de 155 genes potencialmente específicos do bacilo descritos em estudo de Marri e colaboradores (2006), foram identificadas apenas 13 proteínas produzidas por esses genes, o que parece indicar que apenas uma pequena porcentagem das proteínas únicas do *M. leprae* são expressas em quantidades suficientes para torna-las boas candidatas para o sorodiagnóstico da hanseníase. As 13 proteínas identificadas tiveram suas sequências de aminoácidos analisadas por meio do *Blastp*, com o objetivo de identificar os homólogos mais próximos. Três proteínas apresentavam homólogos no *M. tuberculosis* (ML0050, ML0410 e ML0593) e duas no *Mycobacterium ulcerans* (ML0126 e ML1106). Dentre as oito proteínas restante, potencialmente restritas, duas se destacaram por não apresentar homologia com outras micobactérias e por serem expressas em maiores quantidades - a ML 2346 (proteína hipotética) e a ML2347 (proteína hipotética conservada). A ML2498 (enoil-coA hidratase hipotética) também foi expressa em boas quantidades, embora apresente homologia de 74% com proteína do *Mycobacterium smegmatis*. A ML1553 (prolil-tRNA sintetase) e ML0308 (proteína hipotética) também não apresentavam homologia com outras micobactérias e foram expressas em quantidades intermediárias. Já as proteínas ML0938 (proteína hipotética) ML0527 (ausente no *Blastp*) e ML2177 (uridina fosforilase) foram expressas em quantidades muito pequenas. Ainda assim, as duas últimas se destacaram por não apresentar homologia com nenhuma bactéria conhecida (WIKER; TOMAZELLA; SOUZA, 2011).

#### **2.4.7. Genômica**

A sequência genômica completa do *M. leprae* foi descrita em 2001 (COLE *et al.*, 2001). O genoma do bacilo contém 3.268.203 pares de bases (3.27 MB) e, quando comparado ao genoma do *M. tuberculosis* (4.41MB), revela um caso

extremo de evolução redutiva. Menos da metade do pequeno genoma contém genes funcionais (49,5%) e o restante contém pseudogenes (27%) e regiões não codificadoras (23,5%). Essa redução no tamanho do genoma eliminou diversas vias metabólicas, deixando o *M. leprae* com necessidades de crescimento muito específicas. Ao todo, estão presentes 1.604 genes potencialmente ativos, dos quais 165 não apresentam ortólogos no *M. tuberculosis*. As proteínas produzidas por esses genes poderiam ajudar no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos para hanseníase (COLE *et al.*, 2001). Posteriormente, descreveu-se a sequência genômica completa de uma cepa de *M. leprae* proveniente do Brasil, observando-se 99.99% de identidade com a sequência descrita anteriormente, proveniente de uma cepa indiana (MONOT *et al.*, 2009).

Apesar do genoma do *M. leprae* já estar disponível e validado, a anotação das regiões codificadoras de proteínas ainda está em revisão devido às características únicas do patógeno, como a massiva redução do genoma e elevado número de pseudogenes (COLE *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2009).

Existe diferença significativa no número de regiões codificadoras preditas em dois diferentes bancos de dados. O Leproma relatou a presença de 1614 genes e 113 pseudogenes não traduzidos (<http://genolist.pasteur.fr/Leproma/>). Já o CMR-TIGR (*comprehensive microbial resource- the institute for genomic research*) relatou a existência de 5446 genes (<http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>). Estudo buscou validar as anotações de regiões codificadoras disponíveis em bancos de dados por meio de identificação de proteínas por espectrometria de massa de alto desempenho. Das 1046 proteínas identificadas, 1039 estavam preditas nos bancos de dados. Das sete proteínas não preditas em nenhum dos bancos de dados, cinco eram codificadas por pseudogenes, que após uma análise minuciosa parecem se tratar de genes verdadeiros, e duas eram codificadas por genes não preditos previamente. Os resultados indicam que o Leproma apresenta elevada acurácia na predição de regiões codificadoras e falhou em identificar apenas 11 proteínas presentes no banco de dados muito mais extenso CMR-TIGR (SOUZA *et al.*, 2009).

Em relação ao número de genes específicos do *M. leprae* identificados em estudos de genômica, há pequenas diferenças, com variação de 136 (ARAOZ *et al.*, 2006) até 165 (COLE *et al.*, 2001). Em um estudo comparativo do genoma do *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium avium* e *M. leprae*, foram

identificados 155 genes restritos ao *M. leprae* e ausentes nas outras espécies de micobactérias (MARRI; BANNANTINE; GOLDING, 2006).

Desde o sequenciamento e posterior anotação do genoma do *M. leprae*, houve enorme progresso na pesquisa e identificação de antígenos proteicos que podem ser úteis no diagnóstico da hanseníase (GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011). Por meio da análise comparativa das anotações dos genomas das micobactérias, diversos investigadores selecionaram quadros de leitura aberta (*open reading frame* – ORF) encontrados apenas no genoma do *M. leprae*. Análise posterior dessas sequências potencialmente específicas por meio de ferramentas de bioinformática identificaram antígenos hipotéticos que podem ser testados quanto sua capacidade de induzir resposta de célula T ou de produzir anticorpos (GELUK *et al.*, 2005; SPENCER *et al.*, 2005; ARAOZ *et al.*, 2006; SPENCER *et al.*, 2011; GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011).

Em 2005, GELUK e colaboradores selecionaram 17 genes do *M. leprae* sem homologia com o *M. tuberculosis*. Análise genômica comparativa com o genoma de outras micobactérias identificou que cinco desses genes apresentam ortólogos no *M. avium paratuberculosis* ou no *M. ulcerans*. Das 12 proteínas potencialmente específicas restantes, cinco antígenos (ML0576, ML1989, ML1990, ML2283, ML2567) induziram produção significativamente maior de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em pacientes PB, em comparação aos controles negativos de área endêmica e aos pacientes com tuberculose (GELUK *et al.*, 2005).

Em outro estudo que analisou de forma comparativa o genoma do *M. leprae* e de outras micobactérias, quatro proteínas potencialmente específicas, além de 58 peptídeos derivados de 26 quadros de leitura aberta, foram selecionadas para avaliação do seu potencial para utilização em testes diagnósticos para hanseníase. As quatro proteínas recombinantes avaliadas (ML0008, ML0126, ML1057 e ML2567) desencadearam maior produção de IFN- $\gamma$  nos pacientes PB do que nos controles. Trinta e cinco dos 58 peptídeos testados (60%) desencadearam produção de IFN- $\gamma$  apenas nos pacientes PB e nos contatos domiciliares (SPENCER *et al.*, 2005).

Estudo de Araújo e colaboradores selecionou 12 genes para análise, dos quais dois eram restritos ao *M. leprae* e ausentes em todos os genomas conhecidos (classe I), quatro eram presentes no bacilo da hanseníase e ausentes nos genomas de outras micobactérias (classe II) e seis eram proteínas de distribuição limitada (classe III). A imunogenicidade das proteínas produzidas por esses 12 genes foi

avaliada em pacientes com hanseníase, por meio da produção de anticorpos circulantes ou de IFN- $\gamma$ . Duas proteínas de classe II, ML0308 e ML2498, se destacaram por desencadear resposta humoral e celular marcantes. Dessa forma, as duas proteínas são candidatas promissoras para diagnóstico tanto de formas PB quanto de formas MB de hanseníase (ARAOZ *et al.*, 2006).

Estudo posterior de Spencer e colaboradores concentrou em seis proteínas recombinantes imunologicamente ativas e sabidamente capazes de desencadear resposta imune humoral ou mediada por células. A reatividade do soro de pacientes com hanseníase foi avaliada por meio de Western Blot e ELISA utilizando as seis proteínas recombinantes selecionadas. As respostas com as proteínas ML2028 (Ag85B) e ML2038 (bacterioferritina) foram consistentemente altas em pacientes PB e MB e fracas ou ausentes em controles de área endêmica. O estudo mostrou que a utilização dessas proteínas como antígenos em testes sorológicos poderia aumentar a probabilidade de detecção de anticorpos em pacientes TT e BT, de forma a melhorar a sensibilidade dos testes disponíveis, especialmente em casos PB (SPENCER *et al.*, 2011).

Estudo desenvolvido no estado de Goiás avaliou 33 proteínas recombinantes potencialmente específicas do *M. leprae* quanto a reatividade imunológica. Predição *in silico* indicou que todas as proteínas selecionadas apresentavam epítomos para células B e T. A predição foi claramente contraditória com os resultados observados nos ensaios de sangue total e de ELISA, nos quais a maioria dos antígenos não induziu secreção de IFN ou apresentou reatividade IgG. Apenas as proteínas ML0405, ML2055 e ML2331 foram capazes de desencadear resposta imune humoral específica em casos MB, assim como resposta celular em pacientes PB (SAMPAIO *et al.*, 2011).

Peptídeos derivados de proteínas específicas de *M. leprae* também já foram avaliados para o diagnóstico de hanseníase (DOCKRELL *et al.*, 2000; SPENCER *et al.*, 2005; GELUK *et al.*, 2008). Estudo que avaliou 58 peptídeos mostrou que embora a produção de IFN- $\gamma$  seja mais robusta com as proteínas recombinantes, os testes com peptídeos apresentaram maior especificidade, com menos resultados positivos em controles saudáveis de área endêmica e em pacientes com tuberculose. Assim, o estudo parece indicar que o uso de múltiplos peptídeos para compor uma proteína quimérica poderia resultar no desenvolvimento de um teste diagnóstico com alta sensibilidade e especificidade (SPENCER *et al.*, 2005). Esses

achados foram corroborados por estudo que avaliou 50 peptídeos sintéticos derivados de cinco diferentes proteínas específicas do *M. leprae*. Quatro peptídeos induziram a produção de IFN- $\gamma$  em pacientes com hanseníase e em contatos domiciliares de casos da doença, mas não em controles saudáveis ou em indivíduos com tuberculose. Quando a resposta cumulativa desses quatro peptídeos foi avaliada, todos os casos de hanseníase e 13 de 14 contatos foram detectados. Nenhum dos controles testados apresentou reatividade. Assim, o estudo fornece evidências de que misturas de peptídeos podem aumentar a sensibilidade dos testes diagnósticos sem comprometer a especificidade (GELUK *et al.*, 2008).

Peptídeos miméticos são bons candidatos para biomarcadores no diagnóstico sorológico de doenças infecciosas, uma vez que são moléculas pequenas que mimetizam antígenos específicos de patógenos (GOULART *et al.*, 2010). Eles podem ser selecionados por meio de *phage display* (PD) utilizando anticorpos policlonais oriundos de amostra de soro de pacientes com hanseníase (GOULART *et al.*, 2010; ALBAN *et al.* 2013). Peptídeos miméticos selecionados por PD podem ser utilizados em diferentes plataformas para diagnóstico da hanseníase, desde ELISA convencional até plataformas biotecnológicas que utilizam biossensores (GOULART *et al.*, 2010; ALBAN *et al.* 2013; ALBAN *et al.* 2014; LIMA *et al.*, 2020; LIMA *et al.*, 2023). Estudo descreveu um peptídeo quimérico que mimetiza a porção trissacarídica do PGL-1. ELISA utilizando esse mimetopo apresentou sensibilidade de 89,1% e especificidade de 100% para diagnóstico de todas as formas clínicas de hanseníase (LIMA *et al.*, 2020). Os peptídeos MPML12 e MPML14 mimetizam uma proteína de choque térmico do *M. leprae* (GroEL) e desencadeiam produção de IgG especialmente nas formas MB da hanseníase. A positividade do ELISA anti-MPML12 foi de 11,8% na forma TT e de 100% na VV. Já a positividade do ELISA anti-MPML14 foi de 20,59% na forma TT e de 92,85% na VV. Pacientes com leishmaniose visceral, tuberculose ou outras micobacterioses não apresentaram reatividade ao ELISA, o que resultou em especificidade de 100% para ambos os antígenos (LIMA *et al.*, 2023).

Novos estudos usando peptídeos e proteínas específicas de *M. leprae* são ainda necessários para confirmar a aplicabilidade das mesmas no diagnóstico da hanseníase em suas formas clínicas PB e MB. Neste contexto, o presente trabalho selecionou proteínas específicas do *M. leprae* descritas em estudos de proteômica e genômica e, após a análise de suas sequências de aminoácidos, construiu duas

proteínas quiméricas inéditas. O desempenho das proteínas foi avaliado por meio do ELISA, com o objetivo de desenvolver um teste laboratorial de elevada acurácia para o diagnóstico da hanseníase.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a antigenicidade de duas proteínas quiméricas recombinantes, compostas por epítomos de linfócitos B presentes em proteínas potencialmente específicas do *M. leprae*, para o diagnóstico laboratorial de formas paucibacilares e multibacilares de hanseníase.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar, por meio de programas de bioinformática, duas quimeras polipeptídicas recombinantes contendo epítomos de linfócitos B presentes em proteínas potencialmente específicas do *M. leprae*, que foram selecionadas por proteômica (proteína quimérica M1) ou genômica (proteína quimérica M2).
- Clonar os genes codificadores das proteínas quiméricas, expressar e purificar as proteínas recombinantes.
- Avaliar a acurácia diagnóstica das quimeras B, por meio da técnica de ELISA, utilizando painel de amostras de soro de pacientes com formas paucibacilares e multibacilares de hanseníase, bem como de indivíduos sem comorbidades conhecidas e de pacientes com outras doenças infecciosas com possível reação cruzada, como doença de Chagas, leishmaniose visceral (LVH), leishmaniose tegumentar (LTA), malária, tuberculose pulmonar (TBC) e em infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).
- Avaliar a positividade do ELISA em amostras de soro de contatos intradomiciliares de casos paucibacilares e multibacilares de hanseníase.



## **4. SUJEITOS DA PESQUISA, MATERIAIS E MÉTODOS**

Para a realização deste trabalho, as proteínas quiméricas construídas tiveram sua acurácia avaliada por ELISA por meio do emprego de amostras de soro de pacientes com hanseníase e também pela utilização de amostras de soro de controles saudáveis, contatos intradomiciliares e de pacientes com outras doenças infecciosas.

### **4.1. PACIENTES**

Foram estudados casos novos de hanseníase com as formas clínicas: I, TT, DT, DD, DV e VV, admitidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes (HEM) de abril de 2022 até novembro de 2023.

#### **4.1.1. Critérios de inclusão**

Casos novos de hanseníase com mais de 18 anos que ainda não iniciaram o tratamento com poliquimioterapia.

#### **4.1.2. Critérios de exclusão**

- Casos novos de hanseníase que iniciaram tratamento em outro serviço.
- Casos de recidiva ou reinício de tratamento após abandono.
- Hanseníase neural primária.
- Pacientes com hanseníase sabidamente portadores de outras doenças infecciosas, como tuberculose, AIDS, leishmaniose tegumentar ou visceral.

### **4.2. CONTROLES**

- Indivíduos sem comorbidades conhecidas e sem história pregressa ou familiar de tuberculose ou hanseníase, moradores de Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Contatos intradomiciliares de casos de hanseníase PB ou MB que foram examinados no Ambulatório de Dermatologia do HEM ou da Universidade Federal

de Sergipe (UFS) e não apresentavam sinais e ou sintomas da doença no momento do exame.

- Pacientes com as seguintes doenças infecciosas, que poderiam apresentar reação sorológica cruzada com hanseníase: doença de Chagas, LV, LTA, HIV, malária e TBC.

#### 4.3. DIAGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA

Os procedimentos diagnósticos de hanseníase, o acompanhamento e o tratamento dos casos foram realizados no Ambulatório de Dermatologia do Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (HEM/FHEMIG). O serviço é credenciado como Centro de Referência Macrorregional em Hanseníase pelo Ministério da Saúde e atende dermatoses em geral, prioritariamente aquelas de interesse sanitário. O ambulatório atende casos de hanseníase originados de demanda espontânea e, principalmente, referenciados de outros serviços para elucidação diagnóstica e orientação terapêutica.

Todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidos a exame dermatoneurológico completo, baciloscopia em quatro sítios e estudo histopatológico da lesão cutânea para confirmação do diagnóstico de hanseníase e para auxiliar na classificação das formas clínicas. Esses procedimentos fazem parte da rotina diagnóstica de casos novos de hanseníase, aos quais todos os pacientes do HEM são submetidos, independentemente da sua participação em pesquisa.

O exame dermatológico foi feito por dermatologistas com experiência no atendimento de pacientes com hanseníase. Após inspeção das lesões cutâneas, a sensibilidade tátil das mesmas foi avaliada com monofilamentos de Semmes-Weinstein. O exame neurológico seguiu as recomendações do Manual de Incapacidades do MS (BRASIL, 2008). Foram realizadas inspeção da face, olhos, nariz e membros, em busca de lesões e deformidades, e palpação dos nervos ulnares, medianos, radiais, tibiais e fibulares comum. O teste de sensibilidade foi realizado com fio dental sem sabor em olhos e com monofilamentos de Semmes-Weinstein em mãos e pés. Em cada mão foram testados três pontos no trajeto de inervação do ulnar, três pontos no trajeto do mediano e um ponto na área de inervação do nervo radial cutâneo. Em cada pé, foram testados sete pontos na área

de inervação do nervo tibial e um ponto na área de inervação do sural, do safeno e do fibular profundo. O teste foi registrado em prontuário, colorindo-se o ponto específico com a cor correspondente ao primeiro monofilamento que o paciente sentiu. A função motora foi avaliada com o teste manual de exploração da força muscular, que analisa a realização do movimento contra a força da gravidade e contra resistência manual. As provas musculares realizadas e os respectivos nervos avaliados foram: abdução do segundo e do quinto dedo (nervo ulnar), abdução do polegar (mediano), extensão do punho (radial), dorsiflexão do pé e extensão do hálux (fibular comum). A força muscular foi graduada de acordo com escala que vai de 0 (ausência de contração) até 5 (realização completa do movimento contra a gravidade com resistência manual máxima). Realizou-se avaliação do tônus dos músculos orbiculares pedindo-se ao paciente que fechasse os olhos suavemente, tentando-se elevar a pálpebra superior com o dedo mínimo.

O exame baciloscópico foi realizado conforme o Guia de Procedimentos Técnicos: Baciloscopia em Hanseníase do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). O raspado intradérmico foi coletado em quatro sítios: lesão cutânea, lóbulo auricular direito, lóbulo auricular esquerdo e cotovelo contralateral à lesão. O material de cada sítio foi espalhado em lâmina, com distância mínima de meio centímetro entre cada esfregaço, e corado pelo método de Ziehl-Neelsen a frio. O exame baciloscópico foi feito utilizando-se a objetiva de imersão e examinando-se sistematicamente 100 campos representativos em cada esfregaço. Para os casos com índices de 4 a 6, a leitura foi realizada em 25 campos. O resultado foi expresso na forma de índice baciloscópico (IB) proposto por Ridley, que é baseado em uma escala logarítmica com variação entre 0 (ausência de bacilos em 100 campos) e 6 (mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo). O IB do paciente foi calculado pela média aritmética dos índices de cada sítio.

A biópsia foi realizada conforme orientações do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase do Ministério da Saúde (BRASIL, 2022). Amostras de pele foram coletadas, preferencialmente das bordas de lesões mais ativas e recentes. O fragmento incluiu toda a espessura da derme e parte da hipoderme e foi corado por meio da técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) para estudo do infiltrado inflamatório e pela coloração de Fite-Faraco ou Wade, para identificação de BAAR. O estudo histopatológico da lesão cutânea foi realizado segundo critérios definidos por Ridley e Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966).

Pacientes com hanseníase I, TT e DT com IB zero e até cinco lesões de pele foram categorizados como paucibacilares para fins de análise estatística. As formas clínicas DT com IB positivo, DD, DV e VV foram classificadas como multibacilares.

#### 4.4. AVALIAÇÃO DOS CONTATOS

Os contatos intradomiciliares dos casos novos de hanseníase PB ou MB foram submetidos a exame físico para avaliar a possibilidade de estarem doentes. Aqueles que não apresentaram sinais e ou sintomas de hanseníase foram convidados a participar da pesquisa como controles. O exame físico dos contatos também faz parte da rotina de atendimento do HEM, independentemente da participação em pesquisa.

Para aumentar o número de amostras, também foram utilizados soros de contatos intradomiciliares coletadas na Universidade Federal de Sergipe (UFS). Essas amostras fazem parte da soroteca do Laboratório de Imunobiologia e Controle de Parasitos (LICP) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e foram cedidas pelo Professor Ricardo Toshio Fujiwara. Os contatos intradomiciliares de casos índice PB ou MB foram submetidos ao exame dermatoneurológico para exclusão da hanseníase, antes da coleta do soro.

#### 4.5. AMOSTRAS DE SORO

Foram colhidas amostras de soro de 41 casos novos de hanseníase, no momento do diagnóstico, e de 118 contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase, após o exame de contato excluir a doença em atividade. As amostras dos casos de hanseníase foram coletadas no Ambulatório de Dermatologia do HEM e as dos contatos no HEM ou na UFS.

Para a obtenção das amostras, sangue periférico foi coletado por punção venosa em tubos de 10 mL sem anticoagulante. As amostras foram identificadas, incubadas por 15 minutos a 37°C e centrifugadas por 10 minutos a 22°C. O soro foi obtido e estocado em freezer a -70°C, até a utilização.

Foram também utilizadas 118 amostras de soro de pacientes com as seguintes doenças: doença de Chagas (n = 28), LV (n = 22), LTA (n = 24), HIV (n =

24), malária (n=10) e tuberculose pulmonar (n = 10). Foram também utilizadas 64 amostras de soro de controles sem comorbidades conhecidas. Essas amostras compõem a soroteca de grupo de pesquisa de LTA da Faculdade de Medicina da UFMG.

#### 4.6. CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

Para a construção das quimeras, foram selecionadas proteínas específicas do *M. leprae* descritas em estudos prévios (nove proteínas identificadas por estudos de proteômica e oito proteínas identificadas por estudos de genômica). Dada a quantidade de proteínas selecionadas, optou-se pela estratégia de se desenhar duas quimeras, haja visto que apenas uma proteína poderia apresentar peso molecular elevado e dificultar sua expressão e purificação por partir de células procariotas.

As sequências de aminoácidos das proteínas selecionadas foram obtidas por meio dos bancos de dados Genbank ou UniProt.

De posse das sequências de aminoácidos, utilizou-se o programa Blast-p (*protein-protein BLAST*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para comparar a similaridade das proteínas selecionadas com as demais proteínas depositadas no banco de dados. Após essa análise, foram selecionadas proteínas com elevada similaridade com o *M. leprae* e baixa similaridade com outras espécies do gênero *Mycobacterium*.

Em seguida, utilizou-se o programa de bioinformática IEDB ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)) para identificar os aminoácidos mais acessíveis presentes na estrutura primária da proteína. Para isso, utilizou-se a ferramenta *B Cell Epitope Prediction*, por meio do parâmetro *Antigen Sequence Properties* e adicionando a estrutura primária da proteína no espaço indicado. Para a análise *in silico*, o método *Emini Surface Accessibility Prediction* foi escolhido. Os parâmetros de análise utilizados foram valores de *window size* de 14 e de *threshold* de 1,0. Os aminoácidos que foram considerados positivos nesta análise foram então destacados na estrutura da proteína.

Na sequência, realizou-se a predição de epítopos por meio do programa de bioinformática ABCpred ([www.imtech.res.in/raghava/abcpred/](http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/)). Os parâmetros de análise utilizados foram valores de *window size* de 16 e *threshold* de 0,85. As

sequências peptídicas que tiveram valor acima de 0,85 foram consideradas positivas. Destacou-se então, essas sequências na estrutura primária da proteína.

Em seguida, as sequências proteicas foram alinhadas por meio do programa Clustal Ômega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Após o alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas de *M. leprae*, analisou-se a similaridade com outras proteínas do mesmo gênero. Assim foram comparadas as sequências epitópicas selecionadas com sequências similares provenientes de proteínas de *Mycobacterium* obtidas por meio do Blast-p.

Para o desenho das proteínas quiméricas, foram utilizados os epítomos preditos pelos programas de bioinformática. 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 se criar um espaçamento entre os epítomos, as sequências foram agrupadas linearmente e espaçadas pela inclusão de aminoácidos glicina e lisina entre elas, de forma a se criar uma única proteína com diferentes epítomos. Posteriormente, realizou-se nova análise por meio do ABCpred para verificar se as regiões definidas previamente permaneciam como epítomos de células B.

Por fim, a estabilidade, as características físico-químicas e a solubilidade das proteínas foram analisadas por meio dos programas ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) e PepCalc (<https://pepcalc.com>).

#### 4.7. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após o desenho das proteínas quiméricas, as sequências de aminoácidos de cada epítopo foram traduzidas para sequência de códons de DNA correspondente, utilizando o Mapa do Código Genético Padrão (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004). Os genes codificadores das proteínas quiméricas foram então sintetizados pela empresa GenScript® (USA).

As regiões codificadoras das proteínas recombinantes foram clonadas no vetor de expressão pET-28a (+) e transformadas por choque térmico em bactérias *Escherichia coli* Artic Express (DE3, Agilent Technologies, EUA) para posterior expressão e purificação. A expressão das proteínas foi realizada com a adição de 1.0 mM de isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG Promega®, Canadá), e as

culturas foram incubadas por 24 horas a 12°C, quando foram rompidas por ultrassonicação, em seis ciclos de 30 segundos cada (90 MHz).

As proteínas foram purificadas por cromatografia de afinidade em colunas de níquel HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences, NJ, EUA) e as amostras obtidas foram dialisadas contra PBS 1x. Após a diálise, as proteínas foram passadas em coluna de agarose-polimixina (Sigma-Aldrich, EUA), para remoção de endotoxinas residuais de bactérias. As amostras purificadas foram aplicadas em gel SDS-PAGE 12% para confirmação da pureza e dosadas pelo método colorimétrico do ácido bicinconínico (BCA) utilizando o kit BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific, Waltham, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante.

#### 4.8. ELISA PARA AVALIAÇÃO DAS QUIMERAS

Foi realizada curva de titulação para a determinação da concentração de antígeno e diluição do anticorpo mais apropriados. Placas de ELISA (Jet-Biofil) foram sensibilizadas com as quimeras, individualmente (1.0 µg/poço, cada) diluídas em 100 µL de tampão de sensibilização pH 9.6 e mantidas por 16 horas a 4°C. Após a sensibilização, as placas foram bloqueadas utilizando 200 µL de solução contendo PBS, Tween 20 0,05% (PBS-T) e 5% de solução de caseína, por uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes, utilizando PBS-T, e foram incubadas com 100 µL das amostras de soro diluídas (1:100) em PBS-T contendo 0,5% de solução de caseína, por uma hora e a 37°C. As placas foram lavadas três vezes utilizando PBS-T e, posteriormente, incubadas com 100 µL do anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, USA) na diluição de 1:10.000, por uma hora e a 37°C. Novamente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e incubadas com solução reveladora composta por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ortho-phenylenediamine e tampão citrato-fosfato pH 5.0, por 30 minutos e no escuro. A reação foi interrompida adicionando-se 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N e a densidade óptica (DO) das amostras foi lida em espectrofotômetro para microplacas de ELISA (Molecular Devices, Spectra Max Plus, Canada), a 492 nm.

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, realizou-se análise descritiva das variáveis utilizadas no estudo. Para as variáveis categóricas, foram feitas tabelas de distribuição de frequência. Para as variáveis numéricas, foram utilizadas medidas de tendência central e variabilidade. Os resultados dos testes de ELISA foram inseridos em planilhas Excel (versão 10.0) e analisados no GraphPad Prism™ (versão 6.0 para Windows). Utilizou-se análise de variância (ANOVA) para comparar as médias da densidade óptica (DO) dos diferentes grupos.

O desempenho diagnóstico dos antígenos nos ensaios de ELISA foi mensurado pela construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e cálculo da área sob a curva (ASC), sensibilidade e especificidade. Os pontos de corte do ELISA foram estabelecidos por meio da curva ROC e seleção dos maiores valores da razão de verossimilhança positiva (RV+). A RV+ expressa a razão entre a probabilidade do teste positivo nos doentes e a probabilidade do teste positivo nos indivíduos sem a doença.

#### 4.10. NORMAS ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE 52767821.8.0000.5149) e do HEM/FHEMIG (CAAE: 52767821.8.3001.5124). 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.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. CONSTRUÇÃO DAS PROTEÍNAS QUIMÉRICAS

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, e oito proteínas descritas por genômica para compor a quimera M2: ML0008, ML0126, ML0308, ML1057, ML2028, ML2038, ML2498 e ML2567.

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 (tabela 1). Para a quimera M2, foram selecionadas as proteínas ML0126 e ML1057 (tabela 2). Duas proteínas (ML0008 e ML2567) não tiveram sua anotação validada pelo banco de dados Uniprot.

**Tabela 1: Análise de similaridade das nove proteínas selecionadas por proteômica com proteínas do *M. leprae* e de outras espécies do gênero *Mycobacterium*.**

Proteína	Nome da Proteína	Similaridade <i>M. leprae</i> (%)	Similaridade com outras espécies (%)
<b>ML0308</b>	Proteína hipotética	100	86,4
<b>ML0333</b>	5-oxiprolinase	100	83,3
<b>ML0369</b>	Proteína hipotética	100	52,9
<b>ML0447</b>	Proteína hipotética	100	57,6
<b>ML0458</b>	Oxidoreductase putativa	100	94
<b>ML0959</b>	Proteína hipotética	100	0
<b>ML1553</b>	Prolina--tRNA ligase	100	92,2
<b>ML2346</b>	Proteína hipotética	100	70
<b>ML2347</b>	Proteína de membrana putativa	100	73

Fonte: BLAST-p.

**Tabela 2: Análise de similaridade das oito proteínas selecionadas por genômica com proteínas do *M. leprae* e de outras espécies do gênero *Mycobacterium*.**

Proteína	Nome da proteína	Similaridade <i>M. leprae</i>	Similaridade com outras espécies
ML0008	Proteína hipotética não caracterizada	100%	0%
ML0126	Proteína hipotética	100%	78,7%
ML0308	Proteína hipotética	100%	86%
ML1057	Proteína hipotética	100%	39%
ML2028	Diacilglicerol aciltransferase	100%	87,8%
ML2038	Bacterioferritina	100%	94%
ML2498	Enoil CoA hidratase	100%	90,4%
ML2567	Proteína hipotética não caracterizada	100%	0%

Fonte: BLAST-p.

As regiões das proteínas que, segundo os programas de bioinformática, continham epítomos de células B foram selecionadas para construir as quimeras. Para compor a proteína M1, foram usadas as sequências peptídicas "IREPRNRVKQTAASHQ" da ML0369, "HHDIAAQTRREIYQNRSDR" da ML0447, "QVQQEKNRPDRVDQHGNS" da ML0959 e "RFAYVDQRKHSRYKPPNPAREGCFV" da ML2346.

Para construir a proteína M2, foram usadas as sequências peptídicas "QASVAYPATSYADFRAHNHWWNGP" e "SLQRSISPNSYNTARVDP" da ML0126 e "QLLGQTADVAGAAKSGPVQPMGDRGSVSPVGQ" da ML1057.

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 e uma lisina entre cada uma, de forma a formar uma única proteína com diferentes epítomos. Foram ainda adicionados dois aminoácidos lisina (LYS) e um aminoácido glicina (GLY) na parte inicial e terminal da proteína, a fim de torná-la solúvel (Figura 1).

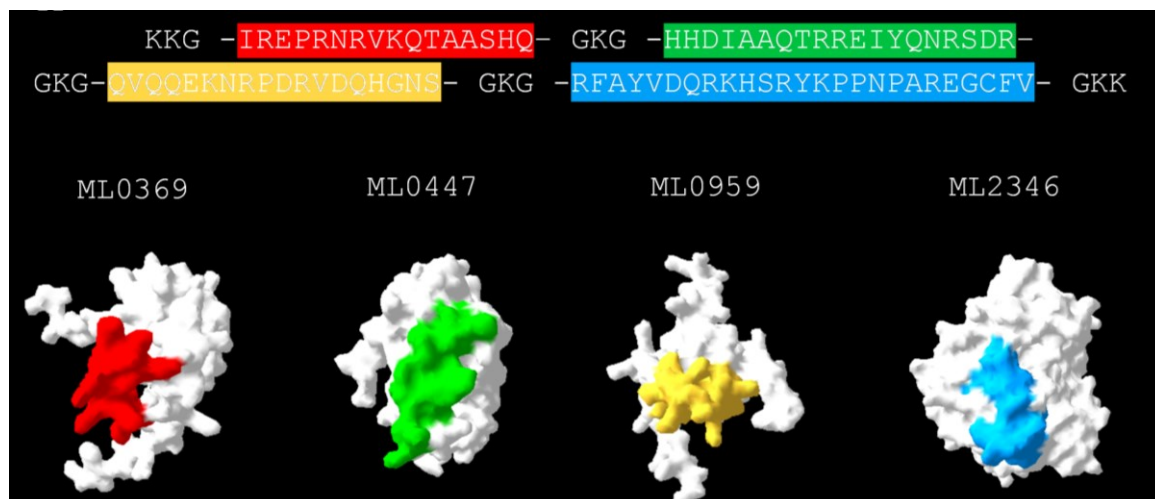
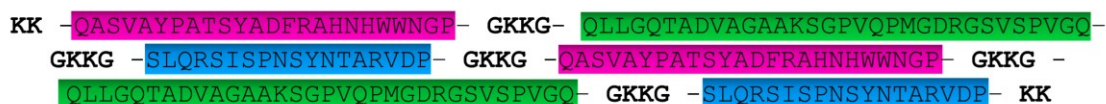
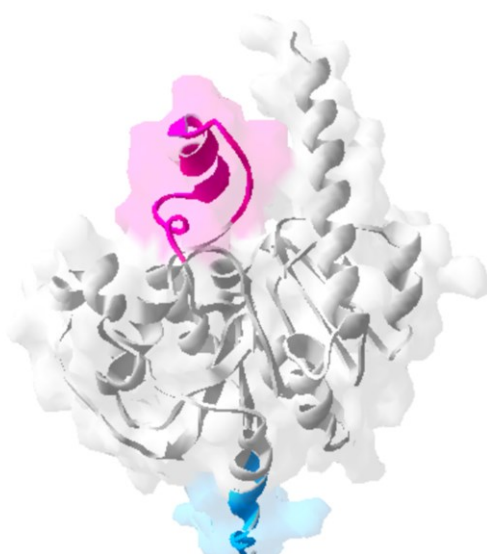


Figura 1: Sequência de aminoácidos das quatro regiões epitópicas selecionadas para compor a proteína quimérica M1, provenientes das proteínas ML0369, ML0447, ML0959 e ML2346.

Para a construção da proteína M2, as sequências peptídicas foram agrupadas linearmente com espaçamento de duas glicinas e duas lisinas entre cada uma. Foram ainda adicionados dois aminoácidos lisina (LYS) na parte inicial e terminal da proteína, a fim de torná-la solúvel (Figura 2).



ML0126



ML1057

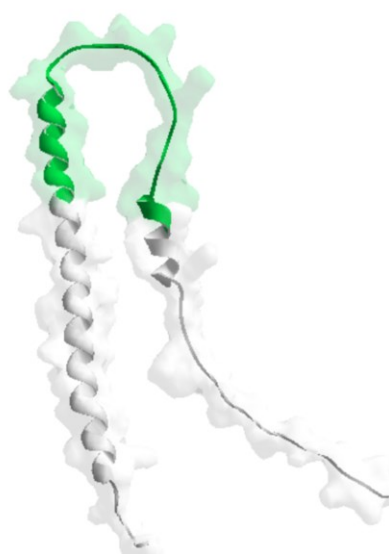


Figura 2: Sequência de aminoácidos das três regiões epitópicas selecionadas para compor a proteína quimérica M2, provenientes das proteínas ML0126 e ML1057.

A nova análise por meio do ABCpred confirmou que as regiões definidas previamente permaneceram como potenciais epítomos de células B em ambas as proteínas quiméricas (Figuras 3 e 4).

```

KKGIREPRNRVKQTAASHQKGHHDDIAAQTRREIYQNRSDRGKQVQEQEKNRPDRVDQHGNSGKGRFAYVDQRKHSRYKPPNPAREGCFVGKK93
-----HSRYKPPNPAREGCFV-----
-----AQTRREIYQNRSDRGK-----
-----QEQEKNRPDRVDQHGNS-----
-----AASHQKGHHDDIAAQT-----
-----YVDQRKHSRYKPPNPA-----
KKGIREPRNRVKQTAA-----
-----PDRVDQHGNSGKGRFA-----

```

**Figura 3: Confirmação da presença de epítomos de células B na construção final da proteína quimérica M1.**

```

KKQASVAYPATSYADFRAHNHWWNGPGKKGQLLGQTADVAGAAKSGPVQPMGDRGSVSPVGGQKKGSLQRSISPNSYNTARVDPKK86
-----QRSISPNSYNTARVDP-----
-----PATSYADFRAHNHWWN-----
-----DFRAHNHWWNGPGKKG-----
-----QLLGQTADVAGAAKSG-----

```

**Figura 4: Confirmação da presença de epítomos de células B na construção final da proteína quimérica M2.**

Por fim, a análise das características físico-químicas mostrou que a proteína quimérica M1 apresentava peso molecular de 10,7 kDa, ponto isoelétrico de 10,83, tempo médio de vida estimado em 1.3 horas em mamíferos e de três minutos em leveduras e em bactérias, boa solubilidade em água e índice de estabilidade de 19.62, o que indica que a proteína é estável.

A análise das características físico-químicas da proteína quimérica M2, mostrou que ela apresentava peso molecular de 18 kDa, ponto isoelétrico de 10,32, tempo médio de vida estimado em 1.3 horas em mamíferos e três minutos em leveduras e em bactérias, boa solubilidade em água e índice de estabilidade de 29.47, o que sugere que a proteína é estável.

## 5.2. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Após o desenho das quimeras, as sequências de aminoácidos de cada epítomo foram traduzidas para sequência de códons de DNA correspondente,

utilizando o Mapa do Código Genético Padrão (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2004). A sequência de códons foi encaminhada para síntese da molécula de DNA pela GenScript.

A sequência de códons da proteína quimérica M1 foi a seguinte:

AAA AAA GGC ATT AGA GAA CCT AGA AAT AGA GTT AAA CAA ACT GCT GCT  
AGT CAT CAA GGC AAA GGC CAT CAT GAT ATT GCT GCT CAA ACT CGT CGT  
GAA ATT TAT CAA AAT AGA AGT GAT GGT GGC AAA GGC CAA GTT CAA CAA  
GAA AAA AAT AGA CCT GAT AGA GTT GAT CAA CAT GGT AAT AGT GGC AAA  
GGC AGA TTT GCT TAT GTT GAT CAA AGA AAA CAT AGT AGA TAT AAA CCT  
CCT AAT CCT GCT AGA GAA GGT TGT TTT GTT GGC AAA AAA

Já a sequência de códons da proteína quimérica M2 foi a seguinte:

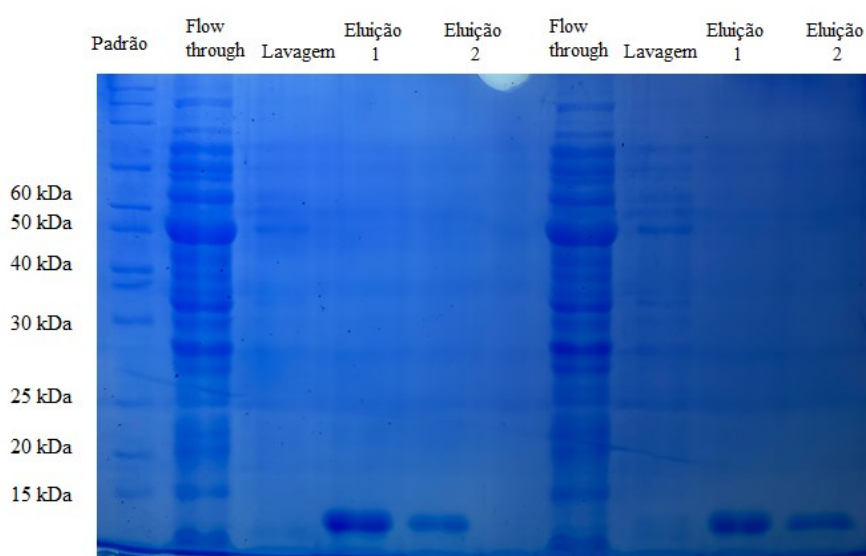
AAA AAA CAA GCT AGT GTT GCT TAT CCT GCT ACT AGT TAT GCT GAT TTT  
CGT GCT CAT AAT CAT TGG TGG AAT GGT CCT GGC AAA AAA GGC CAA CTT  
CTT GGT CAA ACT GCT GAT GTT GCT GGT GCT GCT AAA AGT GGT CCT GTT  
CAA CCT ATG GGT GAT CGT GGT AGT GTT AGT CCT GTT GGT CAA GGC AAA  
AAA GGC AGT CTT CAA CGT AGT ATT AGT CCT AAT AGT TAT AAT ACT GCT  
CGT GTT GAT CCT GGC AAA AAA GGC CAA GCT AGT GTT GCT TAT CCT GCT  
ACT AGT TAT GCT GAT TTT CGT GCT CAT AAT CAT TGG TGG AAT GGT CCT  
GGC AAA AAA GGC CAA CTT CTT GGT CAA ACT GCT GAT GTT GCT GGT GCT  
GCT AAA AGT GGT CCT GTT CAA CCT ATG GGT GAT CGT GGT AGT GTT AGT  
CCT GTT GGT CAA GGC AAA AAA GGC AGT CTT CAA CGT AGT ATT AGT CCT  
AAT AGT TAT AAT ACT GCT CGT GTT GAT CCT AAA AAA

A região codificadora das proteínas quiméricas recombinantes foram clonadas no vetor de expressão pET-28a (+) e transformadas por choque térmico em bactérias *Escherichia coli* Artic Express (DE3, Agilent Technologies, EUA).

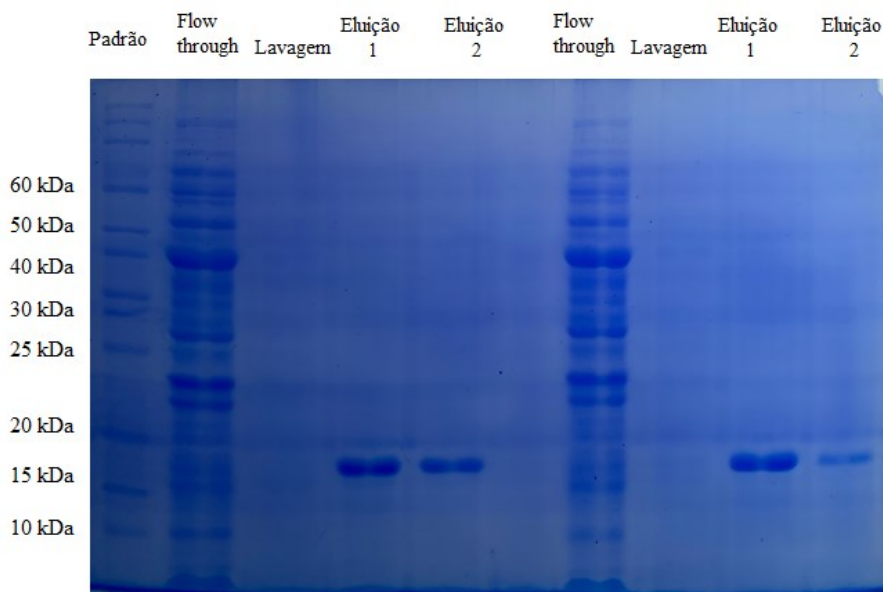
Para verificar a cinética de expressão das proteínas, foi realizado um experimento piloto utilizando 10 mL de cultura das bactérias transformadas. Após a DO das culturas alcançarem uma leitura de 0.4 a 0.6, em comprimento de onda de 600nm, uma alíquota de 1 mL foi removida, sendo correspondente ao tempo não induzido. As culturas foram induzidas com 1 mM de IPTG e alíquotas de 1 mL foram retiradas 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a indução para posterior confirmação da

expressão em gel SDS-PAGE. As proteínas foram expressas em maior concentração após um período de 24 h de indução, em temperatura de 12°C. Para a purificação em larga escala, a expressão das proteínas foi realizada em 2 L de cultura.

Após a expressão e purificação, as amostras obtidas foram submetidas à separação por eletroforese em géis desnaturantes (SDS-PAGE 12,5%) em sistema de eletroforese vertical, Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad). As amostras foram diluídas na proporção de 5:1 em tampão de amostra 6x (125 mM Tris hidroximetil aminometano, SDS 2% v/v, azul de bromofenol, glicerol P.A. 60% v/v e  $\beta$ -mercaptoetanol 10% v/v). As amostras com tampão foram aquecidas a 100°C durante cinco minutos para a desnaturação das proteínas e, posteriormente, aplicadas ao gel para a separação eletroforética. A eletroforese foi realizada utilizando-se tampão de corrida (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e água destilada q.s.p.), sob voltagem de 70 Volts até que as amostras entrassem no gel separador e, em seguida, a 150 Volts. Após a corrida, os géis foram incubados com solução corante Coomassie Blue. Em seguida, os géis foram descorados por lavagens sucessivas em solução descorante (ácido acético 10%, metanol 30% e água destilada 60%), possibilitando a identificação das bandas proteicas no gel. Os géis da purificação das quimeras M1 e M2 são apresentados nas figuras 5 e 6, respectivamente.



**Figura 5:** Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína M1 (~10 kDa). Passagem, lavagem e eluição (eluição 1 e 2) da proteína após a purificação foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE 12%, corado com coomassie brilhante blue G-250.



**Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida da proteína M2 (~18 kDa). Passagem, lavagem e eluição (eluição 1 e 2) da proteína após a purificação foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE 12%, corado com coomassie brilhante blue G-250.**

Em relação ao rendimento, 500 mL de cultura renderam 5 mg de proteína M1 e 3 mg da proteína M2.

### 5.3. AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS QUIMERAS NO ELISA

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.

A análise da acurácia diagnóstica considerou duas possíveis aplicabilidades dos testes sorológicos. Primeiramente, avaliou-se o desempenho das quimeras no diagnóstico da hanseníase em uma população saudável de área de baixa endemicidade para a doença. Para isso, os resultados dos casos foram comparados com os resultados de controles sem hanseníase ou outras comorbidades, moradores de Belo Horizonte, Minas Gerais. Em seguida, avaliou-se a utilidade do teste em diferenciar hanseníase de outras doenças infecciosas, por meio da comparação entre os resultados dos casos e dos pacientes com outras doenças com possibilidade de apresentar reação cruzada.

Foram incluídos 41 pacientes no estudo, dos quais 22 eram do sexo masculino e 19 do sexo feminino. A idade média dos casos foi de 54,8 anos. Todos

os casos classificados como PB apresentavam baciloscopia negativa. Dentre os pacientes classificados como MB, o IB variou de zero até 5,5, com média de 3,2. As características clínicas dos pacientes estão representadas na tabela 3.

**Tabela 3: Características clínicas dos 41 casos novos de hanseníase diagnosticados no Hospital Eduardo de Menezes, no período de abril de 2022 a novembro de 2023.**

Variáveis	Número (%)
<b>Classificação de Ridley e Jopling</b>	
Indeterminada	4 (9,75)
Tuberculoide	2 (4,88)
Dimorfa-tuberculoide	12 (29,27)
Dimorfa-dimorfa	3 (7,32)
Dimorfa-virchowiana	8 (19,51)
Virchowiana	12 (29,27)
<b>Classificação Operacional</b>	
Paucibacilar	16 (39)
Multibacilar	25 (61)
<b>Baciloscopia</b>	
Negativa	20 (48,8)
Positiva	21 (51,2)

Fonte: dados da pesquisa.

### 5.3.1. Proteína quimérica M1

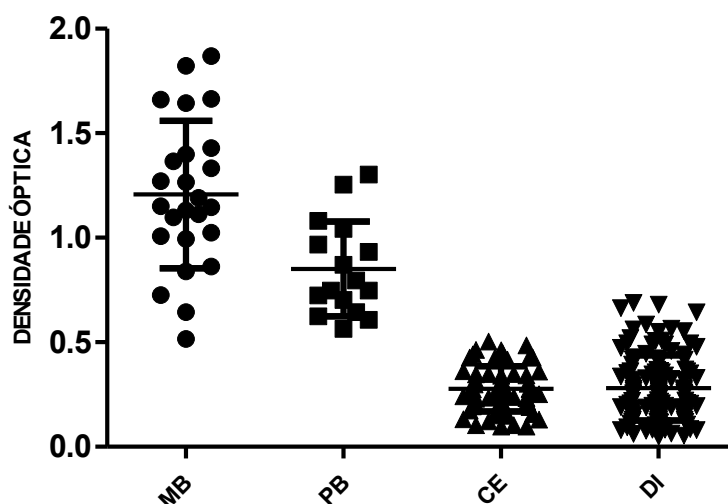
Os resultados do ELISA com a proteína M1 nos diferentes grupos estão representados na tabela 4 e na figura 7.



**Tabela 4: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M1 medidos em valores de densidade óptica (DO) nos grupos casos multibacilares (MB), casos paucibacilares (PB), controles sem doenças conhecidas e pacientes com outras doenças infecciosas.**

	Casos MB	Casos PB	Controles sem doenças	Doenças infecciosas
Número de casos	25	16	64	118
Média	1,207	0,8507	0,2776	0,2814
Desvio padrão	0,3530	0,2273	0,1089	0,1554
Mínimo	0,5165	0,5650	0,0980	0,0490
Percentil 25	1,001	0,6588	0,1968	0,1543
Mediana	1,151	0,7720	0,2645	0,2570
Percentil 75	1,415	1,023	0,3498	0,3696
Máximo	1,870	1,303	0,5050	0,6900

Fonte: Dados da pesquisa.



**Figura 7: Resultados do ELISA anti-M1 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), controles sem doenças conhecidas (CE) e pacientes com outras doenças infecciosas (DI). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo.**

Houve diferença significativa entre as médias de 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 ( $p < 0,05$ ).

A figura 8 mostra separadamente os resultados do ELISA anti-M1 para cada uma das doenças infecciosas testadas.

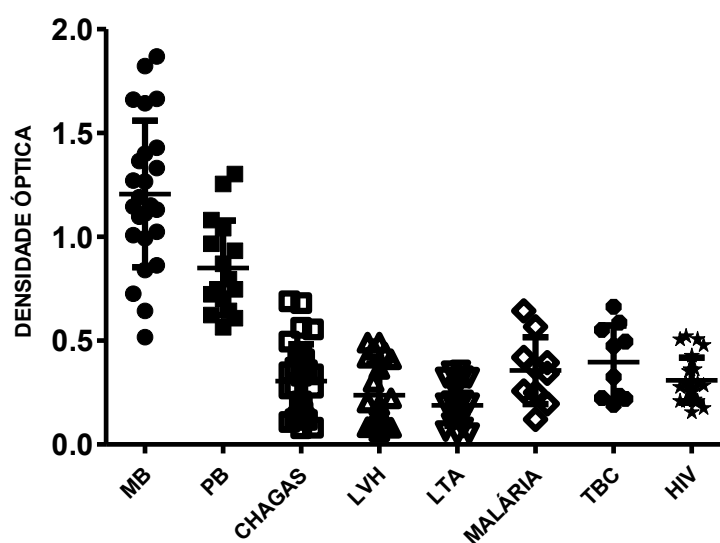


Figura 8: Resultados do ELISA anti-M1 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), doença de Chagas, leishmaniose visceral (LVH), leishmaniose tegumentar americana (LTA), malária, tuberculose pulmonar (TBC) e infecção pelo HIV. Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo.

Na análise dos resultados do ELISA por meio da curva ROC, a área sob a curva (ASC) foi de 1 tanto para pacientes PB quanto para pacientes MB em comparação aos resultados dos controles sem doenças conhecidas (Figura 9).

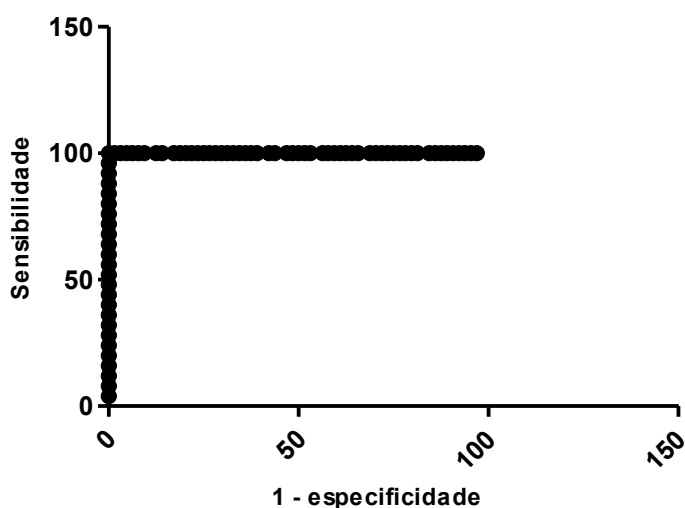


Figura 9: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M1 em pacientes PB e MB em comparação com controles sem doenças conhecidas moradores de Belo Horizonte.

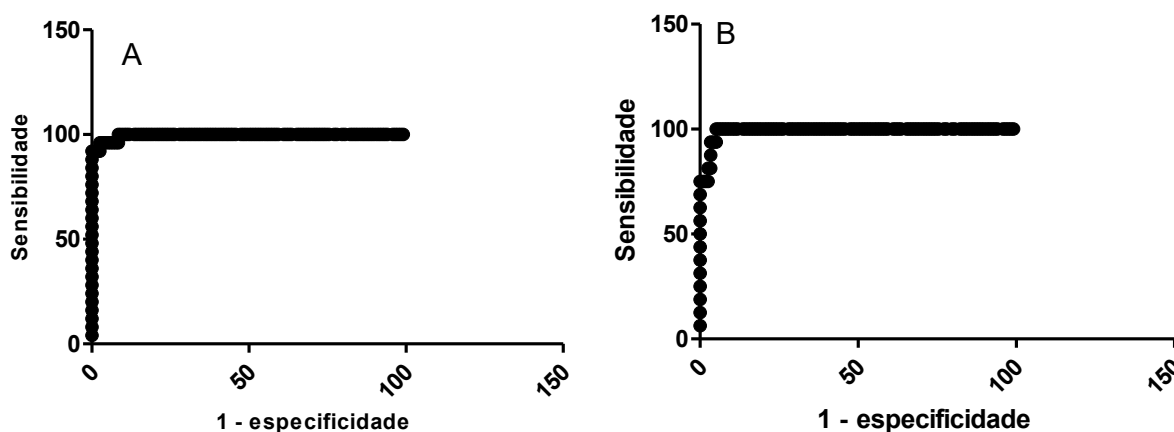
A proteína M1 apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98,44% para diagnóstico tanto de casos MB quanto PB em uma população saudável. A tabela 5 mostra os resultados da análise por curva ROC dos casos PB e MB em comparação com controles sem doença conhecidas, moradores de Belo Horizonte.

**Tabela 5: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M1 dos casos MB e PB em comparação com controles sem doenças conhecidas (CE), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95).**

	ASC (IC95)	Valor-p	Ponto de corte	Sen % (IC95)	Esp % (IC95)	RV+
<b>MB x CE</b>	1,00 (1,0-1,0)	< 0,0001	> 0.4950	100,0 (86,28-100)	98,44 (91,6-99,96)	64,00
<b>PB x CE</b>	1,00 (1,0-1,0)	<0,0001	> 0.4950	100,0 (79,41- 100)	98,44 (91,6-99,96)	64,00

Fonte: dados da pesquisa

Quando os resultados do ELISA anti-M1 dos pacientes com hanseníase foram comparados com os resultados dos pacientes com outras doenças infecciosas, a ASC foi de 0,995 nos casos MB e de 0,991 nos casos PB (Figura 10).



**Figura 10: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M1 em pacientes MB (A) e PB (B) em comparação com pacientes com outras doenças infecciosas.**

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%. A tabela 6 mostra os resultados da análise por curva ROC dos casos PB e MB em comparação com os resultados dos pacientes com outras doenças infecciosas.

**Tabela 6: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M1 dos casos MB e PB em comparação com os resultados de outras doenças infecciosas (DI), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95).**

	ASC (IC95)	Valor-p	Ponto de corte	Sen % (IC95)	Esp % (IC95)	RV+
<b>MB x DI</b>	0,9956 (0,988-1,00)	< 0,0001	> 0,6855	92,00 (73,97-99,02)	99,15 (95,37-99,98)	108,56
<b>PB x DI</b>	0,9910 (0,979-1,00)	<0,0001	> 0,6855	75,00 (47,62-92,73)	99,15 (95,37-99,98)	88,50

Fonte: dados da pesquisa.

### 5.3.2. Proteína quimérica M2

Os resultados do ELISA com a proteína M2 nos diferentes grupos estão representados na tabela 7 e na figura 11. Houve diferença estatisticamente significativa entre as médias de 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 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M2 medidos em valores de densidade óptica (DO) nos grupos casos multibacilares (MB), casos paucibacilares (PB), controles sem doenças conhecidas e pacientes com outras doenças infecciosas.**

	Casos MB	Casos PB	Controles sem doenças	Doenças infecciosas
Número de casos	25	16	64	118
Média	1,124	0,9019	0,3402	0,2563
Desvio padrão	0,3845	0,3188	0,1741	0,1811
Mínimo	0,3755	0,3205	0,1300	0,0475
Percentil 25	0,8883	0,7663	0,2123	0,1369
Mediana	1,056	0,8865	0,2625	0,1890
Percentil 75	1,487	1,167	0,4795	0,3080
Máximo	1,828	1,353	0,7555	0,8405

Fonte: Dados da pesquisa.

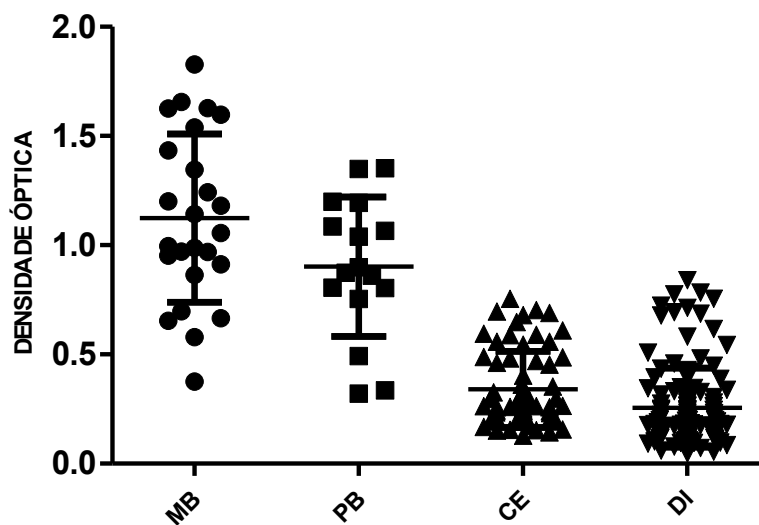


Figura 11: Resultados do ELISA anti-M2 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), controles sem doenças conhecidas (CE) e pacientes com outras doenças infecciosas (DI). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo.

A figura 12 mostra os resultados do ELISA com a proteína M2 para cada doença infecciosa testada separadamente.

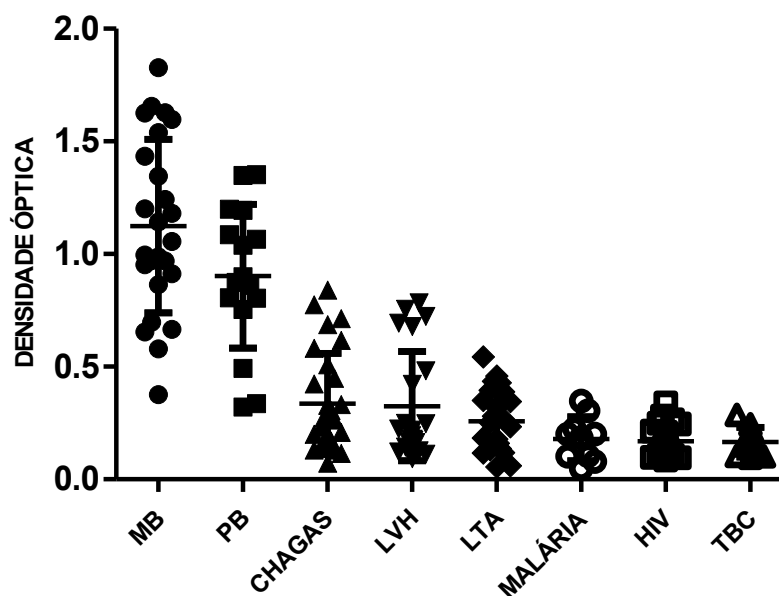


Figura 12: Resultados do ELISA anti-M2 nos grupos multibacilar (MB), paucibacilar (PB), doença de Chagas, leishmaniose visceral (LVH), leishmaniose tegumentar americana (LTA), malária, tuberculose pulmonar (TBC) e infecção pelo HIV. Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo.

Na análise dos resultados do ELISA por meio da curva ROC, a área sob a curva (ASC) foi de 0,97 para pacientes MB e de 0,94 para pacientes PB em comparação aos resultados dos controles sem doenças conhecidas (Figura 13).

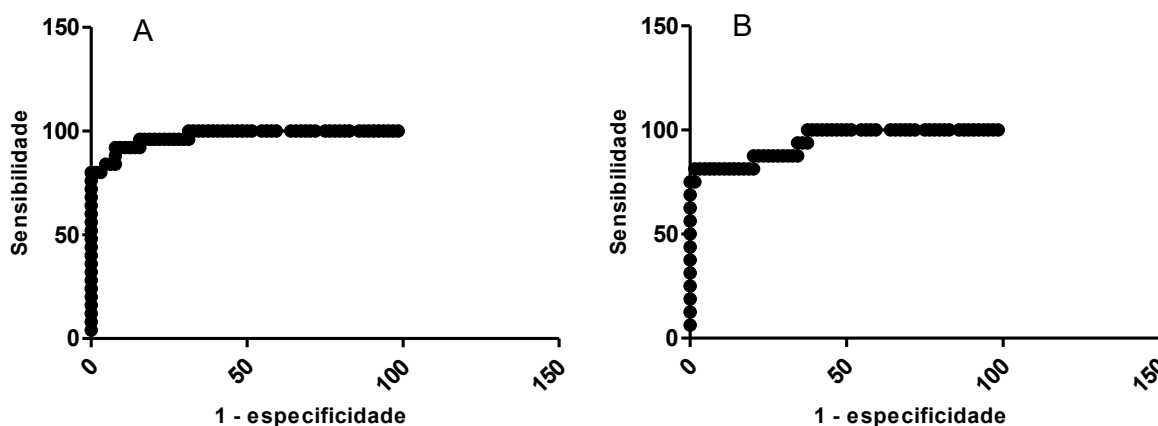


Figura 13: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M2 em pacientes MB (A) e PB (B) em comparação com controles sem doenças conhecidas moradores de Belo Horizonte.

A proteína M2 apresentou sensibilidade de 80% e especificidade de 98,44% para diagnóstico de casos MB em uma população saudável. Já para casos PB, a sensibilidade e especificidade foram, respectivamente, 75 e 98,44%. A tabela 8 mostra os resultados da análise por curva ROC dos casos PB e MB em comparação com controles sem doenças conhecidas moradores de Belo Horizonte.

Tabela 8: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M2 dos casos MB e PB em comparação com controles sem doenças conhecidas (CE), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95).

	ASC (IC95)	Valor-p	Ponto de corte	Sen % (IC95)	Esp % (IC95)	RV+
<b>MB x CE</b>	0,9734 (0,943-1,00)	< 0,0001	> 0,730	80,00 (59,30-93,17)	98,44 (91,60-99,96)	51,20
<b>PB x CE</b>	0,9414 (0,876-1,00)	< 0,0001	> 0,7545	75,00 (47,62-92,73)	98,44 (91,60-99,96)	48,00

Fonte: dados da pesquisa.

Quando os resultados do ELISA anti-M2 dos pacientes foram comparados com os resultados dos pacientes com outras doenças infecciosas, a ASC foi de 0,98 nos casos MB e de 0,96 nos casos PB (Figura 14).

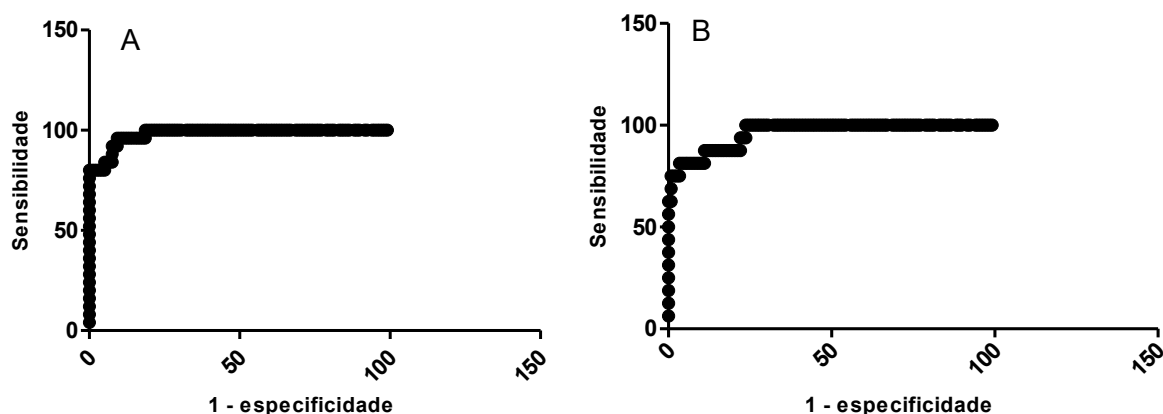


Figura 14: Curva ROC com resultados do ELISA anti-M2 em pacientes MB (A) e PB (B) em comparação com pacientes com outras doenças infecciosas.

Na avaliação do desempenho da proteína quimérica M2 em diferenciar casos de hanseníase de outras doenças infecciosas, a sensibilidade foi de 80% em casos MB e de 62,5% em casos PB. A especificidade foi de 99% em ambos os grupos. A tabela 9 mostra os resultados da análise por curva ROC dos casos PB e MB em comparação com os resultados dos pacientes com outras doenças infecciosas.

Tabela 9: Análise por curva ROC dos resultados do ELISA anti-M2 dos casos MB e PB em comparação com os resultados de outras doenças infecciosas (DI), com valores da área sob a curva (ASC), ponto de corte do ELISA, razão de verossimilhança positiva (RV+), sensibilidade (Sen), especificidade (Esp) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95).

	ASC (IC95)	Valor-p	Ponto de corte	Sen % (IC95)	Esp % (IC95)	RV+
<b>MB x DI</b>	0,9807 (0,960-1,00)	< 0,0001	> 0,8125	80,00 (59,30-93,17)	99,15 (95,37-99,98)	94,40
<b>PB x DI</b>	0,9613 (0,920-1,00)	<0,0001	> 0,8228	62,50 (35,43- 84,80)	99,15 (95,37-99,98)	73,75

Fonte: dados da pesquisa

#### 5.4. AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DOS CONTATOS

Foram incluídos no estudo 118 contatos intradomiciliares de hanseníase, dos quais 57 eram contatos de pacientes PB e 61 de pacientes MB.

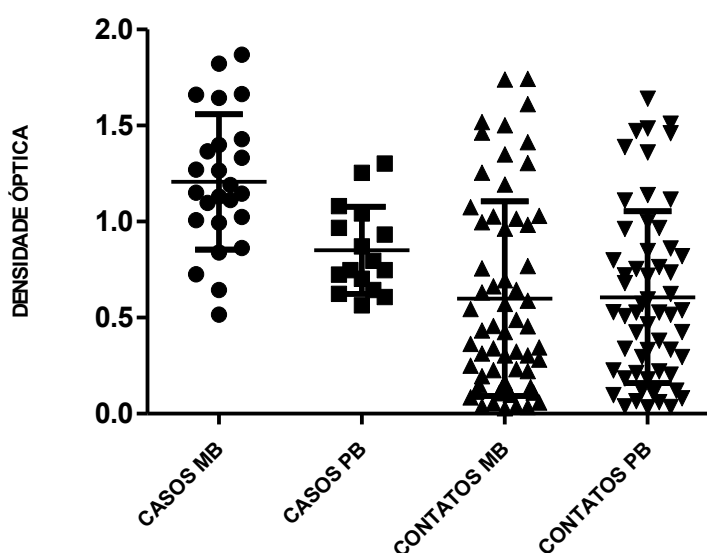
### 5.4.1. Proteína quimérica M1

Os resultados do ELISA com a proteína M1 dos contatos intradomiciliares de caso índice MB (contatos MB) e dos contatos intradomiciliares de caso índice PB (contatos PB) estão representados na tabela 10 e na figura 15.

**Tabela 10: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M1 medidos em valores de densidade óptica (DO) dos casos MB, casos PB, contatos intradomiciliares de caso índice MB e contatos intradomiciliares de caso índice PB.**

	Casos MB	Casos PB	Contatos MB	Contatos PB
Número de casos	25	16	61	57
Média	1,207	0,8507	0,5990	0,6061
Desvio padrão	0,3530	0,2273	0,5066	0,4475
Mínimo	0,5165	0,5650	0,0295	0,0341
Percentil 25	1,001	0,6588	0,1560	0,2170
Mediana	1,151	0,7720	0,4335	0,5275
Percentil 75	1,415	1,023	1,007	0,8545
Máximo	1,870	1,303	1,745	1,642

Fonte: Dados da pesquisa.



**Figura 15: Resultados do ELISA anti-M1 nos grupos multibacilar (casos MB), paucibacilar (casos PB), contatos intradomiciliares de caso índice MB (contatos MB) e de contatos intradomiciliares de caso índice PB (contatos PB). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo.**

Não houve diferença significativa na média dos valores de DO na comparação entre os grupos contatos MB e contatos PB e entre os casos PB e ambos os grupos



de contatos. Houve diferença estatisticamente significativa na média de DO dos casos MB quando comparada às médias dos contatos PB ou MB ( $p < 0,05$ ).

Em seguida, avaliou-se a positividade do ELISA anti-M1 nos contatos de hanseníase. Para isso, utilizou-se como ponto de corte o valor de DO de 0,4950, advindo da análise por curva ROC que comparou casos de hanseníase com controles sem doenças conhecidas moradores de Belo Horizonte. A tabela 11 mostra a positividade do ELISA nos contatos PB e MB.

**Tabela 11: Positividade do ELISA anti-M1 nos 57 contatos intradomiciliares de casos PB e nos 61 contatos intradomiciliares de casos MB.**

ELISA	Contatos PB (%)	Contatos MB (%)
Negativo	25 (43,9)	34 (55,7)
Positivo	32 (56,1)	27 (44,3)

Fonte: dados da pesquisa.

#### 5.4.2. Proteína quimérica M2

Os resultados do ELISA com a proteína M2 dos contatos intradomiciliares de caso índice MB (contatos MB) e dos contatos intradomiciliares de caso índice PB (contatos PB) estão representados na tabela 12 e na figura 16.

**Tabela 12: Resultados do ELISA com a proteína quimérica M2 medidos em valores de densidade óptica (DO) dos casos MB, casos PB, contatos intradomiciliares de caso índice MB e contatos intradomiciliares de caso índice PB.**

	Casos MB	Casos PB	Contatos MB	Contatos PB
Número de casos	25	16	61	57
Média	1,124	0,9019	0,4535	0,5402
Desvio padrão	0,3845	0,3188	0,4361	0,3880
Mínimo	0,3755	0,3205	0,0005	0,0025
Percentil 25	0,8883	0,7663	0,1210	0,1990
Mediana	1,056	0,8865	0,2745	0,4865
Percentil 75	1,487	1,167	0,7870	0,7985
Máximo	1,828	1,353	1,698	1,519

Fonte: Dados da pesquisa.

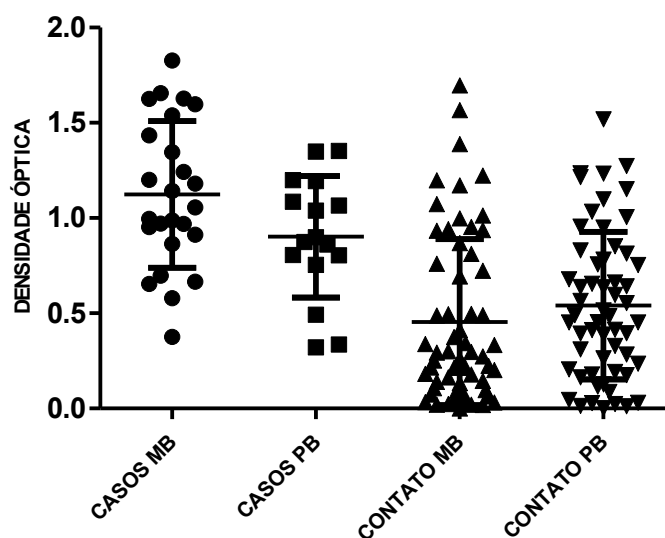


Figura 16: Resultados do ELISA anti-M2 nos grupos multibacilar (casos MB), paucibacilar (casos PB), contatos intradomiciliares de caso índice MB (contatos MB) e de contatos intradomiciliares de caso índice PB (contatos PB). Cada ponto no gráfico representa o valor de densidade óptica de cada amostra individual de soro. As linhas horizontais representam a média e o desvio padrão de cada grupo.

Não houve diferença significativa na média dos valores de DO na comparação entre os contatos MB e contatos PB. Contudo, houve diferença estatisticamente significativa na comparação das médias entre os seguintes grupos: casos PB e contatos PB, casos PB e contatos MB, casos MB e contatos PB e casos MB e contatos MB ( $p < 0,05$ ).

Por fim, avaliou-se a positividade do ELISA anti-M2 nos contatos intradomiciliares de hanseníase. Para isso, utilizou-se como ponto de corte o valor de DO de 0,7545, advindo da análise por curva ROC que comparou os resultados do ELISA de casos de hanseníase com controles sem doenças conhecidas moradores de Belo Horizonte. A tabela 13 mostra a positividade do ELISA nos contatos PB e MB.

Tabela 13: Positividade do ELISA anti-M2 nos 57 contatos intradomiciliares de casos PB e nos 61 contatos intradomiciliares de casos MB.

ELISA	Contatos PB (%)	Contatos MB (%)
Negativo	41 (71,9)	45 (73,8)
Positivo	16 (28,1)	16 (26,2)

Fonte: dados da pesquisa.

Com os resultados preliminares obtidos com parte da amostra do presente estudo, dois artigos científicos foram gerados e submetidos para avaliação de publicação:

**Artigo 1:** “Serodiagnosis of paucibacillary and multibacillary leprosy using a recombinant chimeric protein composed by specific B-cell epitopes from *Mycobacterium leprae* proteins”. Assis *et al.* (submetido à revista *Tuberculosis* [ISSN: 1873-281X]).

**Artigo 2:** “Preliminary assay from a new recombinant chimeric protein developed by bioinformatics for the serological diagnosis of leprosy”. Assis *et al.* (submetido à revista *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [ISSN: 0732-8893]).

## 6. DISCUSSÃO

Com o objetivo de desenvolver um teste sorológico de elevada acurácia para o diagnóstico da hanseníase, o presente estudo desenvolveu e testou a reatividade de duas proteínas quiméricas inéditas, que foram construídas a partir de epítomos de células B presentes em proteínas específicas do *M. leprae*. Ambas são específicas e apresentaram pouca reatividade nos controles sem comorbidades e até mesmo em pacientes com outras doenças infecciosas. As proteínas apresentaram sensibilidade alta para o diagnóstico das formas PB e MB da hanseníase. Destaca-se o bom desempenho da quimera M1 em detectar os casos PB, que são de difícil diagnóstico com os exames laboratoriais disponíveis até o momento. Portanto, as proteínas quiméricas, principalmente a M1, mostraram-se promissoras para utilização no diagnóstico de hanseníase em suas duas classificações operacionais. A soropositividade entre os contatos domiciliares de hanseníase foi elevada na sorologia com ambas as proteínas quiméricas, em especial com a M1. A alta sensibilidade em detectar infecção subclínica sugere uma possível aplicação da sorologia com as quimeras no acompanhamento dos contatos e na seleção daqueles com maior risco de adoecer.

O desenvolvimento de um teste laboratorial simples e eficaz, capaz de confirmar a suspeita clínica, é de importância crucial no enfrentamento da hanseníase, em especial em unidades básicas de saúde e em áreas remotas onde existem poucos especialistas capazes de diagnosticar e tratar tal doença. Contudo, o diagnóstico da hanseníase permanece essencialmente clínico e nenhum exame laboratorial é suficiente para o diagnóstico. Portanto, a falta de um teste de alta acurácia contribui para o atraso no diagnóstico, o que, por sua vez, acarreta continuidade na cadeia de transmissão e aumento do risco de incapacidades físicas (LASTORIA; ABREU, 2014; WHO, 2018; BRASIL, 2022).

Embora já existam testes sorológicos para hanseníase, eles apresentam baixa sensibilidade para a detecção das formas iniciais e PB da doença (WHO, 2018). A presença de anticorpos anti-PGL-1 nos testes sorológicos reflete a carga bacilar, com títulos elevados em pacientes MB e baixos ou ausentes em pacientes PB (FUJIWARA; IZUMI, 1987; BUHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; LOBATO *et al.*, 2011). O mesmo ocorre quando proteínas recombinantes são utilizadas como antígeno em plataformas de teste rápido ou ELISA (DUTHIE *et al.*, 2007; HUNGRIA

*et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014a; DUTHIE *et al.*, 2014b; FABRI *et al.*, 2015; FREITAS *et al.*, 2016, AMORIM *et al.*, 2016; LETURIONDO *et al.*, 2019).

Com o objetivo de desenvolver novos antígenos para o sorodiagnóstico da hanseníase, foram selecionadas proteínas descritas como potencialmente específicas do *M. leprae* em estudos prévios de proteômica ou genômica. A análise dessas proteínas por meio de programas de bioinformática resultou no desenvolvimento de duas proteínas quiméricas inéditas.

A quimera M1 possui peso molecular de 10,7 KDa, e a M2 de 18 kDa. Ambas são estáveis e apresentam boa solubilidade em água. As proteínas quiméricas recombinantes foram expressas em *Escherichia coli* Artic Express transformadas com o vetor de expressão pET-28a(+) e, posteriormente, purificadas por cromatografia de afinidade em colunas de níquel. O processo possibilitou a produção das quimeras em larga escala, para que pudessem ser usadas como antígeno em testes sorológicos.

O desempenho de ambas as quimeras para o sorodiagnóstico da hanseníase foi avaliado por meio de ELISA, considerando-se duas possíveis aplicabilidades do teste: diagnóstico da doença em uma população sem doenças conhecidas e diagnóstico diferencial com outras doenças infecciosas.

Primeiramente, avaliou-se a capacidade das quimeras em diagnosticar casos de hanseníase em uma população saudável moradora da cidade de Belo Horizonte. Nessa avaliação, a proteína quimérica M1 apresentou sensibilidade de 100% (IC 95%: 86,28-100) e a proteína M2 apresentou sensibilidade de 80% (IC: 59,30-93,17) para diagnóstico de casos MB. Já para a detecção de casos PB, a sensibilidade da M1 foi de 100% (IC: 79,41- 100) e a da M2 foi de 75% (IC: 47,62-92,73).

A sensibilidade elevada das proteínas M1 e M2 em diagnosticar casos MB corrobora achados de outros estudos que mostram resultados semelhantes em testes sorológicos com diferentes antígenos. Em pacientes MB, a sensibilidade da sorologia foi de 100 % com a proteína recombinante ML0411 (PARKASH *et al.*, 2006) e variou de 66,7 (FABRI *et al.*, 2015) a 97,4% (BUHRER-SEKULA *et al.*, 2003) com o PGL-1. Já com a proteína LID-1, a sensibilidade variou de 65 (WEN *et al.*, 2014) a 89% (HUNGRIA *et al.*, 2012; FABRI *et al.*, 2015; AMORIM *et al.*, 2016). Valores consistentemente elevados de sensibilidade também foram observados

quando o antígeno NDO-LID foi testado, com resultados variando de 71,7% (FABRI *et al.*, 2015) a 95,7% (DUTHIE *et al.*, 2014a).

Já a sensibilidade das proteínas quiméricas M1 (100%) e M2 (75%) em diagnosticar casos PB em uma população sem doenças conhecidas foi maior que a encontrada em diferentes estudos já publicados. Existe grande variabilidade na sensibilidade dos testes sorológicos em detectar casos PB. Os valores variaram de 8 até 70% com PGL1 (FREITAS *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2013); de 7 até 53,3% com LID-1 (HUNGRIA *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2013) e de 6 até 73,7% com NDO-LID (AMORIM *et al.*, 2016; DUTHIE *et al.*, 2014a).

Além de diferenças nos antígenos e nas técnicas laboratoriais usadas, a escolha do ponto de corte do ELISA pode influenciar na positividade dos testes. Em estudo com o antígeno LID-1 em plataforma de ELISA, o ponto de corte foi definido como 2 x o valor médio da DO dos controles endêmicos ou  $DO > 0,1$ , o que resultou em sensibilidade de 20% em pacientes PB (DUTHIE *et al.*, 2007). Já em outro estudo com LID-1, o ponto de corte selecionado foi 2 x o desvio padrão dos controles endêmicos ou  $DO > 0,3$ , o que determinou uma sensibilidade de 7% para detecção de casos PB (HUNGRIA *et al.*, 2012).

As características dos pacientes incluídos nos estudos também interferem nos resultados dos testes. Quando um teste sorológico é aplicado da mesma maneira em diferentes regiões geográficas, há variação na reatividade e nos parâmetros de sensibilidade, o que poderia ser explicado por variações regionais na genética e na resposta imunológica dos hospedeiros (DUTHIE *et al.*, 2007). Estudos com pacientes oriundos da China apresentaram sensibilidade maior para detecção de casos PB do que estudos com pacientes brasileiros. A sensibilidade em estudos com LID-1 conduzidos na China variou de 36,4 a 53,3% (WEN *et al.*, 2014; WEN *et al.*, 2013) e em dois estudos com casos provenientes do Brasil foi de 7% (HUNGRIA *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2016). O mesmo ocorreu em estudos com os antígenos NDO-LID e PGL-1. A sensibilidade do NDO-LID para detectar casos PB variou de 6% no Brasil a 36,4% na China (AMORIM *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2014). Já com o PGL-1, a sensibilidade foi de 8% em estudo com pacientes PB brasileiros e 70% com chineses (FREITAS *et al.*, 2016; WEN *et al.*, 2013).

Por fim, o nível de endemicidade da área de proveniência dos controles saudáveis também influencia nos resultados dos testes, uma vez que em regiões de elevada endemicidade existe maior risco de a população geral não doente ter sido

exposta a proteínas do *M. leprae* e, dessa forma, apresentar maiores níveis de anticorpos. A reatividade do ELISA com NDO-LID foi avaliada em 182 casos de hanseníase e comparada com os resultados de 89 controles de área não endêmica (Estados Unidos da América). Na análise por curva ROC, a sensibilidade foi de 95,7% para detecção de casos MB e de 73,7% para casos PB. Quando os resultados dos mesmos pacientes foram comparados com os de controles provenientes de áreas endêmicas da Colômbia e das Filipinas, a sensibilidade foi de 90,6% para diagnóstico de casos MB e de 27% para casos PB (DUTHIE *et al.*, 2014a).

Sabe-se que proteínas quiméricas, por serem capazes de expressar diferentes determinantes antigênicos, podem aumentar a sensibilidade de testes diagnósticos (AGUIRRE *et al.*, 2006; BOARINO *et al.*, 2005). O fato de a quimera M1 ser constituída por quatro epítomos provenientes de quatro proteínas do *M. leprae* e de a quimera M2 ser constituída por três epítomos de duas proteínas pode ajudar a explicar a elevada sensibilidade observada no presente estudo.

Características genéticas e imunológicas dos casos selecionados, em especial dos PB, também poderiam contribuir para a alta sensibilidade observada. É possível que os pacientes PB incluídos no estudo não sejam tuberculoides polares e, portanto, apresentem resposta imune humoral relativamente ativa e maior produção de anticorpos.

Por fim, a baixa reatividade do ELISA nos controles selecionados sugere baixa exposição dos mesmos ao *M. leprae*. Análise das características epidemiológicas da cidade de Belo Horizonte, onde os controles foram recrutados; corroboram essa última hipótese. Embora o Brasil tenha um padrão de endemicidade considerado médio (taxa de detecção de casos novos por 100.000 habitantes de 8,59 em 2021), os casos não são distribuídos de maneira uniforme no território nacional e existem áreas hiperendêmicas, como os Estados do Mato Grosso e Tocantins (taxas de detecção, respectivamente, de 58,76 e 47,97) e áreas de baixa endemicidade. Minas Gerais é uma área de média endemicidade, com taxa de detecção de 4,07, em 2021, e Belo Horizonte é uma área de baixa endemicidade, com taxa de detecção de 1,50 casos novos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2023). Dessa forma, moradores de Belo Horizonte, por terem menor chance de exposição ao *M. leprae*, tendem a apresentar menores níveis de anticorpos contra o bacilo. Portanto, a inclusão de controles provenientes de Belo Horizonte pode ter

contribuído para a alta sensibilidade dos testes sorológicos observada no presente estudo.

Embora ambas as proteínas tenham apresentado elevada sensibilidade para diagnóstico de hanseníase, a quimera M1 apresentou resultados superiores. A proteína quimérica M1 é composta por mais regiões epitópicas do que a M2, o que pode ajudar a explicar o seu melhor desempenho. Além disso, o fato de as proteínas da quimera M1 terem sido selecionadas por proteômica pode ter contribuído para a maior sensibilidade. Estudos de genômica permitem avaliar a expressão de grande número de genes e os principais laboratórios de pesquisa já avaliaram mais de 200 proteínas recombinantes quanto ao seu potencial de utilização no diagnóstico de hanseníase (GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011). Já estudos de proteômicas, embora mais dispendiosos, fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre o conjunto de proteínas expressas (JAMES, 1997).

Notavelmente, proteômicas avaliam características biológicas que não podem ser identificadas por análise do DNA, como abundância relativa de uma determinada proteína, modificações pós-translacionais e localização subcelular (JAMES, 1997). Quando a expressão de proteínas do *M. leprae* é analisada por proteômica, muitos dos antígenos preditos por meio de genômica e bioinformática não são expressos ou são expressos em quantidades muito pequenas para serem detectados por exames laboratoriais que não utilizam amplificação, como é o caso da sorologia. Nesse contexto, a ML2346, selecionada para compor a quimera M1, é uma das duas proteínas potencialmente específicas do *M. leprae* expressas em maiores quantidades *in vivo*, o que a torna um antígeno de interesse para estudos diagnósticos (WIKER; TOMAZELLA; SOUZA, 2011). Além disso, as proteínas ML0369, ML0447 e ML0959, que também compuseram a proteína quimérica M1, estão localizadas na parede celular e ou membrana citoplasmática (MARQUES *et al.*, 2008). A localização subcelular mais acessível aos anticorpos do hospedeiro poderia contribuir para o aumento do potencial antigênico dessas proteínas.

Até o momento, não existe teste sorológico com sensibilidade suficiente para diagnóstico de casos PB e a elevada acurácia apresentada pela proteína M1 na detecção desses casos é de grande relevância. A utilização da sorologia com a quimera M1 para a avaliação de casos suspeitos de hanseníase poderia auxiliar na detecção dos casos PB e contribuir para a diminuição de atraso diagnóstico, para a prevenção de incapacidades e redução da transmissão da doença.



Em relação à especificidade, ambas as quimeras apresentaram o mesmo desempenho. A especificidade foi de 98,44% (IC: 91,60-99,96) para diagnóstico de casos MB ou PB em uma população sem doenças conhecidas. Os resultados são compatíveis com os de outros estudos publicados. A especificidade do ELISA anti-LID-1 foi de 96% para a detecção de casos MB em uma população de área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte e de 92,5% para detecção de casos MB e PB no Estado de Minas Gerais (AMORIM *et al.*, 2016; GAMA *et al.*, 2019). Já a especificidade do ELISA anti-NDO-LID foi de 93,2% para diagnóstico de casos PB ou MB em área não endêmica (EUA) e de 85,89% em áreas endêmicas da Colômbia e das Filipinas (DUTHIE *et al.*, 2014a). Em imunocromatografia de fluxo lateral, a especificidade do NDO-LID foi de 96,1% no Estado de Goiás e de 97,4% nas Filipinas (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014b).

O presente estudo também avaliou o desempenho das proteínas quiméricas M1 e M2 para o diagnóstico diferencial entre hanseníase e outras doenças infecciosas, por meio da comparação entre os resultados do ELISA de casos de hanseníase e de pacientes com outras doenças. Nesse cenário, a sensibilidade da quimera M1 foi de 92% (IC: 73,97-99,02) para detectar casos MB e de 75% (IC: 47,62-92,73) para diagnóstico de casos PB. Já em relação à proteína quimérica M2, a sensibilidade foi de 80% (IC: 59,30-93,17) em casos MB e de 62,5% (IC: 35,43-84,80) em casos PB. A especificidade de ambas as quimeras foi de 99,15% (IC: 95,37-99,98) para as duas classificações operacionais.

Poucos estudos analisaram a acurácia dos exames sorológicos em diferenciar os casos de hanseníase de outras doenças. Alguns trabalhos avaliaram a positividade de testes com diferentes antígenos em pacientes com tuberculose pulmonar e mostraram baixa reatividade cruzada. A positividade foi de 3,8 a 4% com PGL-1 (CARDOSO *et al.*, 2013; HUNGRIA *et al.*, 2012), 0% com ML0411 (PARKASH *et al.*, 2006), 9% com LID-1 (WEN *et al.*, 2014) e 0 a 5,7% com NDO-LID (WEN *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2013). Estudo conduzido no Brasil comparou, por meio da curva ROC, os resultados de ELISA de 48 casos MB com os de 46 pacientes com outras dermatoses. Essas dermatoses fazem diagnóstico diferencial clínico com hanseníase e são, em sua maioria, doenças inflamatórias, como eczema e pitiríase alba. A ASC foi de 0,89, a sensibilidade foi de 66% e especificidade de 93% no ELISA anti-PGL-1. Já na sorologia anti-LID-1, a ASC foi de 0,97, a

sensibilidade de 87,5% e especificidade de 100%. Os resultados dos casos PB não foram comparados com os das outras doenças (FREITAS *et al.*, 2016).

A reação cruzada é um problema potencial que deve ser considerado no desenvolvimento de um novo teste sorológico. Isso é particularmente importante em países com elevada incidência de tuberculose, alta cobertura vacinal com BCG e elevados níveis de exposição à micobactérias ambientais, como é o caso de países tropicais como o Brasil (BAUMGART *et al.*, 1993; CARDOSO *et al.*, 2013).

No presente estudo, a reatividade dos controles sem doenças conhecidas aos testes sorológicos foi menor que a dos casos de hanseníase para as duas proteínas testadas. Tal fato pode indicar que esses indivíduos apresentaram baixa exposição ao *M. leprae* e a outras micobactérias ao longo da vida. Como no Brasil a cobertura vacinal com BCG é elevada, a baixa reatividade dos controles também sugere que a vacinação por BCG não interfere nos resultados dos testes. Além disso, o presente estudo avaliou a reatividade cruzada com uma grande diversidade de doenças infecciosas tropicais que, potencialmente, poderiam apresentar resultados falso-positivos nos testes sorológicos. Uma das doenças avaliadas foi a tuberculose, uma vez que o *M. tuberculosis* é a bactéria geneticamente mais semelhante ao *M. leprae*, o que aumenta o risco de reação cruzada (COLE *et al.*, 2001). Não encontramos na literatura trabalhos que tenham avaliado um painel sorológico mais ampliado de doenças infecciosas.

Os resultados do presente estudo sugerem que o risco de reação cruzada com as doenças tropicais avaliadas, dentre elas a tuberculose, é pequeno. Dessa forma, ambas as proteínas testadas apresentaram elevada especificidade para o diagnóstico de hanseníase em uma população saudável e em uma população acometida por outras doenças infecciosas.

Por fim, o estudo avaliou a positividade do ELISA nos contatos intradomiciliares de casos de hanseníase. A positividade da sorologia com a quimera M1 foi de 56,1% em contatos de caso índice PB e de 44,3% em contatos de caso índice MB. Já com a proteína quimérica M2, 28,1% dos contatos PB e 26,2% dos contatos MB foram positivos. Não houve diferença estatisticamente significativa na média dos valores de DO na comparação entre os contatos MB e contatos PB, na sorologia com ambas as quimeras. Também se observou que alguns contatos domiciliares apresentaram altos níveis de anticorpos contra as duas proteínas quiméricas testadas, com DO semelhante às dos casos MB.

A taxa de positividade entre os contatos MB e, principalmente, entre os PB, foi maior do que em outros estudos, nos quais a soropositividade variou de 1,7 até 43,2% em contatos de pacientes MB (CARDOSO *et al.*, 2013; FABRI *et al.*, 2015) e de 0 a 26,1% em contatos de casos PB (FABRI *et al.*, 2015). Alguns estudos mostraram que as taxas de positividade são maiores entre os contatos de casos MB, já que eles apresentam maior exposição ao bacilo (ARAUJO *et al.*, 2012; FABRI *et al.*, 2015). Outros trabalhos avaliaram apenas contactantes de pacientes MB (HUNGRIA *et al.*, 2012; WEN *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014b) ou não separaram os contatos conforme a classificação operacional do caso índice (FRADE *et al.*, 2017). Contudo, em estudo conduzido em Goiás com 75 contatos, a taxa de positividade foi maior entre contatos de casos PB em dois testes sorológicos. A soropositividade em contatos de casos PB e MB foi de, respectivamente, 6,7 e 1,7% no ELISA anti-PGL-1 e de 13,3 e 3,3% no teste rápido com NDO-LID (CARDOSO *et al.*, 2013). Em estudo que avaliou 365 contatos domiciliares de hanseníase por meio de ELISA, não houve diferença estatisticamente significativa na média da DO dos contatos de casos PB e dos contatos de caso MB quando o LID-1 foi usado como antígeno. Alguns contatos também apresentaram altos níveis de anticorpos contra os antígenos LID-1 e NDO-LID, com DO semelhante às dos casos MB (AMORIM *et al.*, 2016). Estudo com 191 contatos conduzido em Minas Gerais também não observou diferença estatisticamente significativa na positividade do ELISA anti-PGL-1 e do ML *Flow* entre contactantes de caso índice PB e de caso índice MB (LOBATO *et al.*, 2011).

Sabe-se que, além da classificação operacional do caso índice, outros fatores podem influenciar no risco de adoecimento, entre eles a proximidade, a duração do contato, as características da habitação, fatores comportamentais, nutricionais e genéticos dos indivíduos expostos (FINE *et al.*, 1997). Tais fatores não foram avaliados no presente estudo e poderiam ajudar a explicar a positividade mais elevada entre contatos de casos PB observada.

Contatos domiciliares, devido sua alta proximidade com um caso índice de hanseníase, apresentam maior risco de desenvolver a doença do que a população geral (DOULL *et al.*, 1942; FINE *et al.*, 1997; AMORIM *et al.*, 2016; GAMA *et al.*, 2019). Pacientes MB não tratados são provavelmente a principal fonte de transmissão. Estudos longitudinais conduzidos nas Filipinas e em Malawi estimaram que contatos intradomiciliares de pacientes MB apresentam risco relativo para

desenvolvimento de hanseníase oito vezes maior do que a população geral, enquanto o contato domiciliar com casos PB aumenta o risco de adoecimento em duas vezes (DOULL *et al.*, 1942; FINE *et al.*, 1997).

A soropositividade em contatos de hanseníase constitui indicativo de infecção subclínica (ARAUJO *et al.*, 2012; GOULART *et al.*, 2015; ARAUJO *et al.*, 2016; FRADE *et al.*, 2017). Estudos longitudinais mostraram que contatos soropositivos apresentam risco 5,6 a 7,2 vezes maior de desenvolver hanseníase do que os soronegativos (DOUGLAS *et al.*, 2004; GOULART *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2015; ARAUJO *et al.*, 2016). Portanto, os contatos domiciliares, em especial aqueles com sorologia positiva, devem ser monitorizados de forma mais rigorosa, com o objetivo de diagnosticar a doença precocemente e prevenir incapacidades.

Testes sorológicos podem ser usados para identificar os contatos com maior risco de adoecimento e que, portanto, necessitam de acompanhamento mais frequente ou que sejam candidatos a receber quimioprofilaxia (DOUGLAS *et al.*, 2004; GOULART *et al.*, 2008; ARAUJO *et al.*, 2012). O uso de quimioprofilaxia em contatos de hanseníase é uma maneira eficaz de reduzir a incidência da doença e fornece aproximadamente 60% de proteção. A estratégia apresenta melhor custo-efetividade quando usada em contatos domiciliares do que em comunidades de área endêmica como um todo (SMITH; SMITH, 2000). A instituição de tratamento profilático no âmbito de programas de controle de hanseníase seria mais exequível se contatos com maior probabilidade de adoecimento pudessem ser identificados, de forma a concentrar a aplicação de recursos limitados nos grupos de alto risco.

Embora o contato domiciliar seja um claro fator de risco de adoecimento, muitas vezes não é possível identificar histórico de contato próximo com caso índice, o que favorece a hipótese de que a transmissão possa ocorrer em infecção subclínica (FINE *et al.*, 1997; GOULART *et al.*, 2008).

Carreadores assintomáticos do bacilo na mucosa nasal foram identificados em estudos com indivíduos saudáveis moradores de área endêmica. Esses estudos mostraram que 2,9% das amostras de *swab* nasal na Indonésia e 5,9% na Etiópia apresentaram DNA do *M. leprae* detectável por PCR (HATTA *et al.*, 1995; BEYENE *et al.*, 2003). Carreadores assintomáticos do bacilo e pessoas com infecção subclínica são fontes ativas de transmissão da doença e podem ser responsáveis pelos casos de hanseníase em que se desconhece história de contato (HATTA *et al.*, 1995; BEYENE *et al.*, 2003; GELUK; DUTHIE; SPENCER, 2011; ARAUJO *et al.*,

2012). Tal fato se torna ainda mais preocupante quando se leva em consideração a elevada taxa de infecção subclínica encontrada em contatos e não contatos moradores em área endêmica no Brasil (FRADE *et al.*, 2017). Portanto, testes diagnósticos capazes de detectar infecção subclínica são de importância crucial para interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase e redução da taxa de detecção de casos novos.

As duas proteínas quiméricas testadas, em especial a M1, apresentaram elevada sensibilidade para detecção de infecção subclínica nos contatos domiciliares. Outros estudos mostraram que contatos soropositivos para PGL-1 ou LID-1 apresentam maior risco de adoecimento (DOUGLAS *et al.*, 2004; GOULART *et al.*, 2008; DUTHIE *et al.*, 2007). Portanto, é possível que a sorologia com as quimeras M1 e M2 também possam ser usadas para selecionar contactantes com maior risco de adoecimento.

Nesse contexto, os contatos soropositivos devem ser avaliados mais frequentemente, visando ao diagnóstico precoce. Além disso, a sorologia com as quimeras poderia ser utilizada para selecionar os contatos com níveis de anticorpos mais elevados para realização de quimioprofilaxia, caso a prática seja adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil. Também é possível que o acompanhamento sorológico longitudinal dos contatos domiciliares com o ELISA anti-M1 ou anti-M2 possa contribuir para o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, para a prevenção de incapacidades e para a redução na transmissão da doença.

Embora com resultados promissores, o estudo é ainda preliminar e apresenta limitações. Inicialmente, foram avaliados apenas amostras de pacientes diagnosticados no Ambulatório de Dermatologia do HEM e provenientes do Estado de Minas Gerais. Sabe-se que variações regionais na genética e na resposta imunológica dos hospedeiros podem interferir em parâmetros dos testes sorológicos, como na sensibilidade dos mesmos. Portanto, o desempenho das proteínas aqui observado precisa ser confirmado utilizando-se maior número de amostras, incluindo aquelas de pacientes provenientes de outras regiões geográficas. Outra limitação do estudo diz respeito à seleção de controles sem comorbidades apenas em Belo Horizonte, que é uma área de baixa endemicidade para hanseníase. Controles provenientes de áreas de baixa endemicidade podem ter menor exposição ao *M. leprae* e, conseqüentemente, apresentar menores níveis de anticorpos contra o bacilo, o que pode contribuir para aumentar a acurácia dos testes sorológicos. Há

também necessidade de se avaliar maior número de amostras de pacientes acometidos por outras doenças infecciosas, em especial tuberculose, para fins de validação das quimeras para o sorodiagnóstico da hanseníase. Em relação à avaliação dos contatos intradomiciliares de hanseníase, apenas a classificação operacional do caso índice foi levada em consideração. Não foram avaliados outros fatores que podem influenciar no risco de infecção e adoecimento, como a proximidade, a duração do contato, as características da habitação, fatores comportamentais, nutricionais e genéticos, e que poderiam ajudar a explicar a positividade mais elevada encontrada nos contatos de casos PB observada no estudo. Ademais, os contatos foram testados apenas uma vez, no momento do recrutamento para o estudo. É necessário acompanhamento clínico longitudinal para confirmar se os contatos soropositivos, em especial aqueles com maiores níveis de anticorpos contra as proteínas quiméricas, apresentam maior risco de adoecimento.

## 7. CONCLUSÕES

A sensibilidade da proteína quimérica M1 foi de 100% tanto para diagnóstico de casos MB quanto para diagnóstico de casos PB quando os resultados dos casos de ambas as classificações operacionais são comparados aos resultados dos controles sem doença conhecida. Na comparação com os resultados dos pacientes com outras doenças infecciosas, a quimera M1 apresentou sensibilidade de 92% para diagnóstico de casos MB e de 75% para casos PB. Já a proteína quimérica M2, ainda que tenha sensibilidade maior que a observada em estudos com outros antígenos, teve desempenho inferior ao da M1. A sensibilidade foi de 80% para diagnóstico de casos MB em uma população sem comorbidades ou em uma população acometida por outras doenças infecciosas. Já para o diagnóstico de casos PB, a sensibilidade foi de 75% na comparação com os controles sem comorbidades e de 62,5% na comparação com pacientes com outras doenças infecciosas. Em relação à especificidade, as duas quimeras apresentaram valores idênticos de 98,4% na comparação dos casos MB ou PB com controles sem comorbidades, e de 99,2% na comparação com resultados dos pacientes com outras doenças.

Demonstrou-se que 56,1% dos contatos de caso índice PB e 44,3% dos contatos de caso índice MB eram soropositivos no ELISA com a proteína quimérica M1. Já com a proteína quimérica M2, 28,1% dos contatos PB e 26,2% dos contatos MB apresentaram resultados positivos. Valores de DO mais elevados no ELISA em amostras de contatos intradomiciliares do que nos controles sem doenças conhecidas sugere que esses contactantes possam apresentar infecção subclínica.

A elevada sensibilidade e especificidade para diagnóstico tanto de casos MB quanto de casos PB mostra que as proteínas quiméricas, em especial a M1, são antígenos promissores para o diagnóstico de hanseníase e merecem estudos adicionais para confirmar seu desempenho. As proteínas quiméricas, principalmente a M1, também apresentam elevada sensibilidade para detectar infecção subclínica entre os contatos intradomiciliares. Esse dado sugere que a sorologia com as quimeras poderia ser usada para identificar contatos com mais risco de adoecer, de forma a contribuir para o diagnóstico precoce. Essa hipótese precisa ser confirmada em estudos longitudinais com contatos domiciliares de hanseníase.

## 8. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos neste estudo, propõe-se:

- Testar maior número de casos PB e MB e incluir pacientes provenientes de outras regiões geográficas.
- Investigar a reatividade sorológica das quimeras frente a amostras de soro de controles saudáveis coletadas em outras regiões do país.
- Ampliar a testagem de pacientes com outras doenças infecciosas, em especial com tuberculose.
- Utilizar a sorologia com as quimeras no acompanhamento longitudinal dos contatos intradomiciliares de hanseníase para verificar se contactantes soropositivos apresentam maior risco de adoecer do que os soronegativos.
- Desenvolver uma plataforma de teste rápido utilizando a quimera de melhor resultado nos ensaios de ELISA em sistemas de fitas de contrafluxo lateral (LFF) e avaliar a acurácia para diagnóstico da hanseníase, comparando com os resultados do ELISA.



## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, S.; SILBER, A. M.; BRITO, M. E. *et al.* Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 10, p.3768-74, 2006.
- ALBAN, S. M.; DE MOURA, J. F.; MINOZZO, J. C. *et al.* Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 42, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-42>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2334-13-42>.
- ALBAN, S. M.; DE MOURA, J. F.; THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106222, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106222>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106222>.
- AMORIM, F. M.; NOBRE, M. L.; FERREIRA, L. C. *et al.* Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 9, e0004934, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004934>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27658042>. Acesso em: 4 out. 2023.
- ARAOZ, R.; HONORE, N.; CHO, S. *et al.* Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infect Immun**, v. 74, n.1, p. 175-82, jan. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FIAI.74.1.175-182.2006>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1346601/>. Acesso em 14 maio 2022.
- ARAÚJO, S.; LOBATO, J.; REIS, E. M. *et al.* Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 55–59, dez. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900010>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/xkzZkfChhqGzvyvqDrZ9YFk>. Acesso em: 6 dez. 2023.
- ARAUJO, S.; REZENDE, M. M.; SOUSA, D. C. *et al.* Risk-benefit assessment of Bacillus Calmette-Guérin vaccination, anti-phenolic glycolipid I serology, and Mitsuda test response: 10-year follow-up of household contacts of leprosy patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 48, n. 6, p. 739-745, 2015. DOI:10.1590/0037-8682-0245-2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26676499/>
- ARAUJO, S.; FREITAS, L. O.; GOULART, L. R. *et al.* Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 11, p.1412-1420, 2016. DOI:10.1093/cid/ciw570. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27558564/>

BAUMGART, K. W.; BRITTON, W. J.; MULLINS, R. J. *et al.* Subclinical infection with *Mycobacterium leprae*: a problem for leprosy control strategies. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, n. 4, p. 412-415, 1993. DOI:10.1016/0035-9203(93)90016-j. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8249066>. Acesso em: 13 dez. 2023.

BERG, J. M.; TYMOCZO, J. L. STRYER, L. **Bioquímica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 1059 p.

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. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/epidemiology-and-infection/article/nasal-carriage-of-mycobacterium-leprae-dna-in-healthy-individuals-in-lega-robi-village-ethiopia/C382D2836FF9041C72BFC74223E1583D>. Acesso em: 13 dez. 2023

BOARINO, A.; SCALONE, A.; GRADONI, L. *et al.* Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diag Lab Immun**, v. 12, n.5, p. 647-53, 2005.

BRASIL. **Manual de Leprologia**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Lepra, 1960. 171 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de prevenção de incapacidades**. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 140 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 54 p.

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/hanseniaze/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-da-hanseniaze-2022/view>. Acesso em: 7 mar. 2023

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-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim\\_hanseniaze-2023\\_internet\\_completo.pdf/view](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2023/boletim_hanseniaze-2023_internet_completo.pdf/view). Acesso em: 12 out. 2023.

BRENNAN, P.J.; BARROW, W. W. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 48, n. 4, p. 382-7, 1980.

BRITTON, W. J.; LOCKWOOD, D. N. Leprosy. **Lancet**, v. 363, n. 9416, p. 1209-19, Apr. 2004.

BUHRER-SEKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C. *et al.* A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 2, p. 133-136, 1998.

BUHRER-SEKULA, S.; SARNO, E. N.; OSKAM, L. *et al.* Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. **Int J Lepr**, v. 68, n. 4, p. 456-63, 2000.

BUHRER-SEKULA, S.; SMITS, H. L.; GUSSENHOVEN, G. C. *et al.* Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 1991-5, 2003.

CARDOSO, L. P. V.; DIAS, R. F.; FREITAS, A. A. *et al.* Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 497, Oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-497>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2334-13-497>. Acesso em: 18 out. 2023.

CHATTERJEE, D.; CHO, S. N.; BRENNAN, P. J. *et al.* Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(2,3-di-O-methyl- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin—the leprosy-specific, natural disaccharide-octyl-neoglycoprotein. **Carbohydr Res**, v. 156, p. 39-56, 1986.

COLE, S. T.; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, p. 1007-11, 2001.

CROSS, H. The prevention of disability for people affected by leprosy: whose attitude needs to change? **Lepr Rev**, v. 78, n. 4, p. 321-9, Dec. 2007.

CRUZ, R. C. S.; BUHRER-SEKULA, S.; PENNA, M. L. F. *et al.* Hanseníase: situação atual, aspectos clínicos, laboratoriais, histórico de tratamento e perspectiva de esquema único para todas as formas clínicas. **An Bras Dermatol**, v. 92, n. 6, p. 764-77, nov./dez. 2017.

DEPS, P.; COLLIN, S. M. *Mycobacterium lepromatosis* as a second agent of Hansen's disease. **Front Microbiol**, v. 12, p. 698588, Sep. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698588>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34566911>. Acesso em: 9 ago. 2023.

DOCKRELL, H. M.; BRAHMBHATT, S.; ROBERTSON, B. D. *et al.* A postgenomic approach to identification of *Mycobacterium leprae*-specific peptides as T-cell reagents. **Infect Immun**, v. 68, n.10, p. 5846-5855, 2000. DOI:10.1128/IAI.68.10.5846-5855.2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10992494/>

DOUGLAS, J. T.; CELLONA, R. V.; FAJARDO JUNIOR, T. T. *et al.* Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 5, p. 897-900, 2004. DOI:10.1128/CDLI.11.5.897-900.2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15358649>. Acesso em: 18 dez. 2023.

DOULL, J. A.; GUINTO, R. S.; RODRÍGUEZ, J. N. *et al.* The incidence of leprosy in Cordova and Tallsay, Cebu, P.I. **Int J Lepr**, v.10, n. 1, p.107-130, 1942.

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>. Acesso em: 10 ago. 2022.

DUTHIE, M. S.; IRETON, G. C.; KANAUIA, G. V. *et al.* Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 10, p. 1590-1597, Oct. 2008. DOI:10.1128/CVI.00168-08. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18716007>. Acesso em: 8 nov. 2023.

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>. Acesso em: 8 nov. 2023.

DUTHIE, M. S.; HAY, M. N.; RADA, E. M. *et al.* Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 10, p. 1257–1265, Oct. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1221-2>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21544695>. Acesso em: 15 nov. 2023.

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>. Acesso em: 13 set. 2022.

DUTHIE, M. S.; BALAGON, M. F.; MAGHANOY, A. *et al.* Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 2, p. 613-619, 2014b. DOI:10.1128/JCM.02085-13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24478496>. Acesso em: 13 set. 2022.

ESPINOSA, O. A.; FERREIRA, S. M. B.; PALACIO, F. G. L. *et al.* Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) in detecting antibodies against *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: a systematic review and meta-analysis. **Can J Infect Dis and Med Microbiol**, v. 2018, p. 9828023, Nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/9828023>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30622658>. Acesso em: 30 ago. 2022.

FABRI, A. C. O. C.; CARVALHO, A. P. M.; ARAUJO, S. *et al.* Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infect Dis**, v. 15, p. 218, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-0962-4>. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26021317>. Acesso em: 20 set. 2023.

FINE, P. E. M.; JOB, C. K.; MCDUGALL, A. C. *et al.* Comparability among histopathologists in the diagnosis and classification of lesions suspected of leprosy in Malawi. **Int. J. Lepr**, v. 54, n. 4, p. 614-25, 1986.

FINE, P. E. M.; STEME, J. A. C.; PÖNNIGHAUS, J. M. *et al.* Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. **Am J Epidemiol**, v. 146, n. 1, p. 91-102, July 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a009195>. Disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article/146/1/91/81751>. Acesso em: 13 dez. 2023.

FRADE, M. A.; DE PAULA, N. A.; GOMES, C. M. *et al.* Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: a comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 2, p. e0005375, Feb 2017. DOI:10.1371/journal.pntd.0005375. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005375>. Acesso em: 06 dez. 2023.

FREITAS, A. A.; HUNGRIA, E. M.; COSTA, M. B. *et al.* Application of *Mycobacterium leprae*-specific cellular and serological tests for the differential diagnosis of leprosy from confounding dermatoses. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 86, n. 2, p.163-168, 2016.

FUJIWARA, T.; HUNTER, S. W.; CHO, S. N. *et al.* Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. **Infect Immun**, v. 43, n. 1, p. 245-52, Jan.1984. DOI:10.1128/iai.43.1.245-252.1984. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/iai.43.1.245-252.1984>. Acesso em: 21 jun. 2023.

FUJIWARA, T.; IZUMI, S. Synthesis of the neoglycoconjugates of phenolic glycolipid-related trisaccharides for the serodiagnosis of leprosy. **Agric Biol Chem**, v. 51, n. 9, p. 2539-2547, 1987. DOI: [10.1080/00021369.1987.10868386](https://doi.org/10.1080/00021369.1987.10868386). Disponível em: <https://academic.oup.com/bbb/article-abstract/51/9/2539/5966662?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 21 jun. 2023.

GAMA, R. S.; SOUZA, M. L. M.; SARNO, E. N. *et al.* A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. **PLoS Negl Trop Dis**, v.13, n. 6, p. e0007400, June 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007400>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0007400>. Acesso em: 04 out. 2023.

GELUK, A.; KLEIN, M. R.; FRANKEN, K. L. M. C. *et al.* Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. **Infect Immun**, v. 73, n. 9, p. 5636-44, Sep. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1128%2FIAI.73.9.5636-5644.2005>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1231107/>. Acesso em: 15 maio 2022.

GELUK, A.; VAN DER PLOEG, J.; TELES, R. O. *et al.* Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity

for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 3, p. 522-533, 2008. DOI:10.1128/CVI.00432-07. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268264/>

GELUK, A.; DUTHIE, M. S.; SPENCER, J. S. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, 402-421, 2011.

GELUK, A.; VAN DER PLOEG, J.; TELES, R. O. *et al.* Rational combination of peptides derived from different *Mycobacterium leprae* proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of *M. leprae* infection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 3, p.522-533, 2008. DOI:10.1128/CVI.00432-07. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268264/>

GOULART, I. M. B.; SOUZA, D. O. B.; MARQUES, C. R. *et al.* Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. **Clin Vaccine Immunol**, v. 15, n. 1, p. 101-105, 2008. DOI:10.1128/CVI.00372-07. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/cvi.00372-07>. Acesso em: 18 dez. 2023.

GOULART, I. M. B.; ARAUJO, S.; FILHO, A. B. *et al.* Asymptomatic leprosy infection among blood donors may predict disease development and suggests a potential mode of transmission. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 10, p. 3345-3348, 2015. DOI:10.1128/JCM.01305-15. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4572540/>

GOULART, L. R.; VIEIRA, C. U.; FRESCHI, A. P. *et al.* Biomarkers for serum diagnosis of infectious diseases and their potential application in novel sensor platforms. **Crit Rev Immunol**, v. 30, n. 2, p. 201-222, 2010. DOI:10.1615/critrevimmunol.v30.i2.70. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20370630/>

HAN, X. Y.; SEO, Y.; SIZER, K. C. *et al.* A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy, **Am J Clin Pathol**, v. 130, n. 6, p. 856–864, Dec. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article/130/6/856/1760256>. Acesso em: 09 ago. 2023.

HATTA, M.; VAN BEERS, S. M.; MADJID, B. *et al.* Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 89, n. 4, p. 381-385, 1995. DOI:10.1016/0035-9203(95)90018-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7570870>. Acesso em: 5 dez. 2023.

HUNGRIA, E. M.; OLIVEIRA, R. M.; SOUZA, A. L. O. *et al.* Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* proteins antigens in different leprosy endemic regions in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, s. 1, p. 104-11, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/vrcFj7qSxv68RpRzjs6qv8f/?lang=en>. Acesso em: 06 set. 2023.

- HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J Bacteriol**, v. 147, n.3, p. 728-35, Sept. 1981. DOI: 10.1128/jb.147.3.728-735.1981. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.147.3.728-735.1981>. Acesso em: 21 jun. 2023.
- HUNTER, S. W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. J. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. **J Biol Chem**, v. 257, n. 24, p. 15072-8, 1982.
- HUNTER, S. W.; RIVOIRE, B.; MEHRA, V. *et al.* The major native proteins of the leprosy bacillus. **J Biol Chem**, v. 265, n.24, p.14065-14068, 1990.
- JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Q Rev Biophys**, v. 30, n. 4, p. 279-331, Nov. 1997. DOI:10.1017/s0033583597003399. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9634650>. Acesso em: 07 abr. 2022.
- JIAN, L.; XIUJIAN, S.; YUANGANG, Y. *et al.* 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**, v. 114, n. 3, p.193-199, 2020.DOI:10.1093/trstmh/trz089. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7092950/>
- LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. M. Hanseníase: revisão de aspectos laboratoriais e terapêuticos – Parte 2. **An Bras Dermatol**. v. 89, n. 3, p. 389-403, mai./jun. 2014.
- LETURIONDO, A. L.; NORONHA, A. B.; NASCIMENTO, M. O. O. *et al.* Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil. **BMC Infect Dis**, v. 19, p. 22, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3653-0>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-018-3653-0>. Acesso em: 18 out. 2023.
- LIMA, M. I. S.; CAPPARELLI, F. E.; OLIVEIRA, J. D. D. *et al.* Biotechnological and immunological platforms based on PGL-I carbohydrate-like peptide of *Mycobacterium leprae* for antibodies detection among leprosy clinical forms. **Front Microbiol**, v. 11, n. 429, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00429. Disponível em: 10.3389/fmicb.2020.00429.
- LIMA, M. I. S.; CORRÊA, M. B. C.; MORAES, E. C. S. *et al.* HSP60 mimetic peptides from *Mycobacterium leprae* as new antigens for immunodiagnosis of Leprosy. **AMB Expr**, v. 13, n.120, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-023-01625-9>. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-023-01625-9#Sec13>.
- LOBATO, J.; COSTA, M. P.; REIS, E. M. *et al.* Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Lepr Rev**, v. 82, n. 4, p. 389-401, 2011.

MARQUES, M. A. M.; CHITALE, S.; BRENNAN, P. J. *et al.* Mapping and identification of the major cell wall-associated components of *Mycobacterium leprae*. **Infect Immun**, v. 66, n. 6, p. 2625-2631, 1998. DOI:10.1128/IAI.66.6.2625-2631.1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC108248>. Acesso em: 7 abr. 2022.

MARQUES, M. A. M.; ESPINOSA, B. J.; SILVEIRA, E. K. X. *et al.* Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 2942-53, Oct. 2004. DOI: [10.1002/pmic.200400945](https://doi.org/10.1002/pmic.200400945). Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200400945>. Acesso em: 24 abr. 2022.

MARQUES, M. A. M.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; SILVEIRA, E. K. X. *et al.* Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2477-91, June 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200700971>. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pmic.200700971>. Acesso em: 24 abr 2022.

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 mai. 2022.

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: 23 mai. 2022.

MENDIRATTA, V.; KHAN, A.; JAIN, A. Primary neuritic leprosy: a reappraisal at a tertiary care hospital. **Indian J Lepr**, v. 78, n. 3, p. 261-7, 2006 Jul-Sep 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17120509>.

MONOT, M.; HONORE, N.; GARNIER, T.; *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. **Nat Genet**, v. 41, n. 12, p. 1282-9, Dec 2009.

MOURA, R. S.; CALADO, K. L.; OLIVEIRA, M. L. W. *et al.* Sorologia da hanseníase utilizando PGL1: revisão sistemática. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, s.2, p. 11-18, 2008.

MUÑOZ, M.; BELTRÁN-ALZATE, J. C.; DUTHIE, M. S. *et al.* Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay using either natural octyl disaccharide-leprosy IDRI diagnostic or phenolic glycolipid-I antigens for the detection of leprosy patients in Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 98, n. 1, p. 274-277, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0500>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5928725>. Acesso em: 20 set. 2023



PARKASH, O.; KUMAR, A.; NIGAM, A. *et al.* Evaluation of recombinant serine-rich 45-kDa antigen (ML0411) for detection of antibodies in leprosy patients. **Scand J Immunol**, v. 64, p. 450-455, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01824.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3083.2006.01824.x>. Acesso em: 25 out. 2023.

PARKASH, O.; PANDEY, R.; KUMAR A. *et al.* Performance of recombinant ESAT-6 antigen (ML0049) for detection of leprosy patients. **Lett Appl Microbiol**, v. 44, n. 5, p. 524-530, May 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02099.x>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17451520>. Acesso em: 25 out 2023.

PARKASH, O.; SINGH, B. P. Advances in proteomics of *Mycobacterium leprae*. **Scand J Immunol**, v. 75, p. 369-78, Jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2012.02677.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3083.2012.02677.x>. Acesso em: 28 mar. 2022.

PAYNE, S. N.; DRAPER, P; REES, R. J. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr Other Mycobact Dis**, v. 50, n. 2, p. 220-1, June 1982.

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.

QIONG-HUA, P.; ZHONG-YI, Z.; JUN, Y. *et al.* Early revelation of leprosy in China by sequential antibody analyses with LID-1 and PGL-I. **J Trop Med**, v. 2013, p. 352689, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/352689>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jtm/2013/352689>. Acesso em: 08 nov. 2023.

RADA, E.; DUTHIE, M. S.; REED, S. G. *et al.* Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML0405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 90-4, Dec. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900015>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/TJtHhyMRLgxfyxGRg978ZqM/abstract/?lang=en>. Acesso em: 15 nov. 2023.

REECE, S. T.; IRETON, G.; MOHAMATH, R. *et al.* ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 3, p. 333-340, 2006. DOI:10.1128/CVI.13.3.333-340.2006. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/cvi.13.3.333-340.2006>. Acesso em: 12 ago. 2023.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 34, n. 3, p. 255-73, Jul./Sep. 1966.

RIVOIRE, B.; PESSOLANI, M. C.; BOZIC, C. M. *et al.* Chemical definition, cloning, and expression of the major protein of the leprosy bacillus. **Infect Immun**, v. 62, n. 6, p. 2417-2425, 1994. DOI:10.1128/iai.62.6.2417-2425.1994. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186527/>. Acesso em: 14 ago. 2023.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 6, p. 464-70, Jun 2011.

SAMPAIO, L. H.; STEFANI, M. M.; OLIVEIRA, R. M. *et al.* Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infect Dis**, v. 11, p. 26, Jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-26>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2334-11-26>. Acesso em: 28 maio 2022.

SEHGAL, V. N.; JAIN, M. K.; SRIVASTAVA, G. Evolution of the classification of leprosy. **Int J Dermatol**, v. 28, n. 3, p. 161-7, Apr. 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2651336>.

SMITH, C. M.; SMITH, W. C. Chemoprophylaxis is effective in the prevention of leprosy in endemic countries: a systematic review and meta-analysis. **J Infect**, v. 41, n. 2, p.137-142, Sept. 2000. DOI:10.1053/jinf.2000.0698. Disponível em: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(00\)90698-4/abstract](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(00)90698-4/abstract). Acesso em: 15 dez. 2023.

SPENCER, J. S.; DOCKRELL, H. M.; KIM, H. J. *et al.* Identification of specific proteins and peptides in *Mycobacterium leprae* suitable for the selective diagnosis of leprosy. **J. Immunol**, v.175, p. 7930-8, 2005. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.7930>. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/175/12/7930/73086/Identification-of-Specific-Proteins-and-Peptides>. Acesso em: 14 maio 2022.

SPENCER, J. S.; KIM, H. J.; WHEAT, W. H. *et al.* Analyses of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. **Clin Vaccine Immunol**, v. 18, n. 2, p. 260-7, Feb 2011. DOI:10.1128/CVI.00472-10. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3067349/>. Acesso em: 14 maio 2022.

SOUZA, G. A.; SØFTELAND, T.; KOEHLER, C. J. *et al.* Validating divergent ORF annotation of the *Mycobacterium leprae* genome through a full translation data set and peptide identification by tandem mass spectrometry. **Proteomics**, v. 9, n.12, p. 3233-3243, 2009. DOI:10.1002/pmic.200800955. Disponível em: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pmic.200800955>. Acesso em: 29 abr. 2022.

SOUZA, M. M.; NETTO, E. M.; NAKATANI, M. *et al.* Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *Mycobacterium leprae* infection and leprosy. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 108, n. 8, p. 495-501, 2014. DOI:10.1093/trstmh/tru093. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24907710/>. Acesso em: 08 nov. 2023.

SUNEETHA, S.; SIGAMONI, A.; KURIAN, N. *et al.* The development of cutaneous lesions during follow-up of patients with primary neuritic leprosy. **Int J Dermatol**, v. 44, n. 3, p. 224-9, Mar. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807731>.

TALHARI, C.; TALHARI, S.; PENNA, G. O. Clinical aspects of leprosy. **Clin Dermatol**, v. 33, p. 26-37, 2015.

TALWAR, S.; JHA, P. K.; TIWARI, V. D. Neuritic leprosy: epidemiology and therapeutic responsiveness. **Lepr Rev**, v. 63, n. 3, p. 263-8, Sep 1992. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406021>.

VAN BRAKEL, W. H. Peripheral neuropathy in leprosy and its consequences. **Lepr Rev**, v. 71 Suppl, p. S146-53, Dec 2000.

WEN, Y.; XING, Y.; YUAN, L. *et al.* Whole-blood nested-PCR amplification of *M. leprae* specific DNA for early diagnosis of leprosy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 88, n. 5, p. 918-922, 2013. DOI:10.4269/ajtmh.11-0253. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3752758>. Acesso em: 14 set. 2023.

WEN, Y.; YOU, Y. G.; YUAN, L. *et al.* Evaluation of novel tools to facilitate the detection and characterization of leprosy patients in China. **BioMed Res Int**, v. 2014, p. 371828, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/371828>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/371828>. Acesso em: 14 set. 2023.

WIKER, H. G.; TOMAZELLA, G. G.; SOUZA, G. A. A quantitative view on *Mycobacterium leprae* antigens by proteomics. **J Proteomics**, v. 74, p. 1711-19, 2011. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.01.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21278007>. Acesso em: 25 abr. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes**. Report of a WHO study group. Technical Report Series 675. WHO: Geneva; 1982, 36 p. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/38984>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Leprosy**. 6<sup>th</sup> report. Technical Report Series. WHO: Geneva; 1988, 51 p. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/37409>. Acesso em: 7 jun. 2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Expert Committee on Leprosy**. 7<sup>th</sup> report. Technical Report Series. WHO: Geneva; 1998, 52 p. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-874>. Acesso em: 7 jun. 2022

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: 7 jun. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guideline for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy**. New Delhi: World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem**. Geneva: WHO, 2000. 40 p. Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int)

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.

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: 8 jun. 2022.

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: 12 out 2023.

YOUNG, D. B.; DISSANAYAKE, S.; MILLER, R. A. *et al.* Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. **J Infect Dis**, v. 149, n. 6, p. 870-873, June 1984. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/149.6.870>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-abstract/149/6/870/2190325?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 29 jul. 2023.

YOUNG, R. A.; MEHRA, V.; SWEETSER, D. *et al.* Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. **Nature**, v. 316, n. 6027, p. 450-452, 1985. DOI:10.1038/316450a0. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3894979/>. Acesso em: 28 abr. 2022.

YOUNG, D.; LATHIGRA, R.; HENDRIX, R. *et al.* Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, n.12, p. 4267-4270, 1988. DOI: 10.1073/pnas.85.12.4267. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC280408>. Acesso em: 28 abr. 2022.

## **APÊNDICE A - Termo de consentimento informado para participação em projeto de pesquisa para pacientes**

### **TÍTULO DA PESQUISA: Avaliação da antigenicidade de proteínas quiméricas recombinantes e seu uso para o diagnóstico laboratorial da hanseníase**

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre hanseníase desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Hospital Eduardo de Menezes (HEM-FHEMIG). 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 pode causar. Por isso, leia estas 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.

A pesquisa será desenvolvida no Hospital Eduardo de Menezes (HEM) da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, onde você será acompanhado e tratado para hanseníase. Para confirmação do diagnóstico, você será submetido a 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 nesse projeto de pesquisa. Isso se deve à importância desses exames no diagnóstico, na correta classificação da doença e na escolha do melhor tratamento.

Se você aceitar participar da pesquisa, será necessária a coleta de sangue por punção venosa, ou seja, o técnico do laboratório colherá sangue do seu braço. Essa coleta será realizada apenas na primeira consulta. Esse sangue será usado para realização de testes sorológicos com o objetivo de desenvolver um exame diagnóstico para hanseníase que seja rápido, acessível e capaz de detectar a doença em fases iniciais. Todos os exames necessários são custeados pela equipe da pesquisa. Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento para participar da pesquisa. O sangue coletado será utilizado após a coleta e unicamente para essa pesquisa. Em seguida, será descartado pela equipe da pesquisa.

Após a coleta do exame, 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 6 a 12 meses, dependendo do tipo de hanseníase. O tratamento e o acompanhamento mensal fazem parte da rotina de atendimento de todos os pacientes no Hospital Eduardo de Menezes, independente da participação nessa pesquisa. Portanto, você encontra-se livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, tendo garantido a continuidade no acompanhamento e no 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 pode causar dor e manchas arroxeadas 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. Ressalta-se que as complicações citadas não são frequentes, mas caso ocorram, há uma equipe médica disponível para atendê-lo. Outros riscos potenciais, 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 têm acesso irrestrito à identificação dos participantes. Por fim, 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 outros pacientes. É importante ressaltar que a 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, o orientador da pesquisa e, em certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

**RECUSA E DESISTÊNCIA:** A sua participação neste estudo 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 cessar sua participação a qualquer momento e retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico, sem prejuízo para a continuidade de seu tratamento.

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 (CEP) da UFMG e do HEM, caso surja alguma dúvida sobre implicações éticas do estudo.

**Liberdade de consentimento:** Concordo voluntariamente em participar do estudo 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.

Nome do participante:

Endereço:

Telefone:

E-mail:

Local:

Data:

Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável:

Manoel Otávio da Costa Rocha – Telefone: (31) 3409-9437, [rochamoc@terra.com.br](mailto:rochamoc@terra.com.br)

Pesquisador responsável no Hospital Eduardo de Menezes:

Bárbara Proença Nardi Assis – Telefone: (31) 3328-5057, [barbaranardi@yahoo.com](mailto:barbaranardi@yahoo.com)

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

**CEP-HEM:** Av. Doutor Cristiano Rezende, 2213, Bonsucesso, BH-MG. Cep: 30622-020. Telefone: (31) 3328-5084. E-mail: [hem.cep@fhemig.mg.gov.br](mailto: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 proteínas quiméricas recombinantes e seu uso para o diagnóstico laboratorial da hanseníase**

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa sobre hanseníase desenvolvida por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Hospital Eduardo de Menezes (HEM-FHEMIG). 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 pode causar. Por isso, leia estas 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.

A pesquisa será desenvolvida no Hospital Eduardo de Menezes (HEM) da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, onde você será acompanhado devido ao risco de adoecer por ter tido contato prolongado com um paciente com hanseníase. Você foi inicialmente submetido a exame dermatológico e neurológico e não foram encontrados sinais de que você tenha hanseníase no momento. É importante ressaltar que o exame físico faz parte da rotina de atendimento das pessoas que tiveram contato com pacientes com hanseníase e será realizado em todos os contatos atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, independentemente da participação ou não nesse projeto de pesquisa.

Caso aceite participar da pesquisa, você será encaminhado para a coleta de sangue, nessa primeira consulta. Será colhido sangue do braço por um técnico do Laboratório do Hospital Eduardo de Menezes. Esse sangue será usado para realização de testes sorológicos com o objetivo de desenvolver um exame diagnóstico para hanseníase que seja rápido, acessível e capaz de detectar a doença em suas fases iniciais. Todos os exames necessários são custeados pela equipe da pesquisa. Você não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento para participar da pesquisa. O sangue coletado será utilizado logo após a coleta unicamente para essa pesquisa. Após a utilização, a amostra será imediatamente descartada.



Caso julgue necessário, a equipe do Hospital Eduardo de Menezes agendará um retorno para nova avaliação. É importante ressaltar que o acompanhamento dos contatos faz parte da rotina de atendimento do HEM e ocorrerá mesmo que você não aceite participar desse estudo. Portanto, você encontra-se livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, tendo garantido a continuidade no acompanhamento que vem realizando no Hospital Eduardo de Menezes, 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 pode causar dor ou manchas arroxeadas 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 pouco frequentes, não são graves e tendem a melhorar espontaneamente. Outros riscos potenciais, 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 têm 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:** A sua participação neste estudo poderá contribuir para o desenvolvimento de novos exames diagnósticos para a hanseníase, o que beneficiaria diversos outros pacientes. É importante ressaltar que a sua participação na pesquisa não modificará seu acompanhamento 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, o orientador da pesquisa e, em certas circunstâncias, o Comitê de Ética em pesquisa, poderão ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará.

**RECUSA E DESISTÊNCIA:** A sua participação neste estudo 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 e retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico, 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 (CEP) da UFMG e do HEM, caso surja alguma dúvida sobre implicações éticas do estudo.

**Liberdade de consentimento:** Concordo voluntariamente em participar do estudo 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.

Nome do participante:

Endereço:

Telefone:

E-mail:

Local:

Data:

Assinatura do Paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável:

Manoel Otávio da Costa Rocha – Telefone: (31) 3409-9437, [rochamoc@terra.com.br](mailto:rochamoc@terra.com.br)

Pesquisador responsável no Hospital Eduardo de Menezes:

Bárbara Proença Nardi Assis – Telefone: (31) 3328-5057, [barbaranardi@yahoo.com](mailto:barbaranardi@yahoo.com)

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

**CEP-HEM:** Av. Doutor Cristiano Rezende, 2213, Bonsucesso, BH-MG. Cep: 30622-020. Telefone: (31) 3328-5084. E-mail: [hem.cep@fhemig.mg.gov.br](mailto:hem.cep@fhemig.mg.gov.br)

## ANEXOS

## ANEXO A – Comprovante de Submissão de Artigos

## Diagnostic Microbiology &amp; Infectious Disease

A recombinant chimeric antigen constructed with B-cell epitopes from Mycobacterium leprae hypothetical proteins is effective for the diagnosis of leprosy  
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original article
Keywords:	Leprosy; chimeric protein; ELISA; diagnosis; sensitivity; B-cell epitopes
Corresponding Author:	Eduardo Coelho Federal University of Minas Gerais Belo Horizonte, Brazil
First Author:	Bárbara Assis
Order of Authors:	Bárbara Assis
	Ana Thereza Chaves
	Daniela Lage
	Mariana Cardoso
	Isabela Pereira
	Raquel Câmara
	Camila Freitas
	Vívian Martins
	Fernanda Ludolf
	Ana Laura Oliveira
	Grasiele Tavares
	Ricardo Machado-de-Ávila
	Myron Christodoulides
	Denise Gonçalves
	Lílian Bueno
	Ricardo Fujiwara
	Eduardo Coelho
	Manoel Otávio Costa Rocha

## Tuberculosis

### Serodiagnosis of paucibacillary and multibacillary leprosy using a recombinant chimeric protein composed by specific B-cell epitopes from Mycobacterium leprae proteins --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	TUBE-D-23-00338R1	
<b>Article Type:</b>	Original Article	
<b>Section/Category:</b>	Diagnostics	
<b>Funding Information:</b>	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ-02167-21)	Dr Eduardo Coelho
	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (402417/2023-2)	Dr Eduardo Coelho
<b>Keywords:</b>	Genomics; leprosy; diagnosis; B-cell epitopes; ELISA; chimeric protein.	
<b>Corresponding Author:</b>	Eduardo Coelho Federal University of Minas Gerais BRAZIL	
<b>First Author:</b>	Bárbara Assis	
<b>Order of Authors:</b>	Bárbara Assis	
	Ana Thereza Chaves	
	Daniela Lage	
	Mariana Cardoso	
	Camila Freitas	
	Isabela Pereira	
	Raquel Câmara	
	Vívian Martins	
	Ana Laura Oliveira	
	Ricardo Machado-de-Ávila	
	Alexsandro Galdino	
	Miguel Chávez-Fumagalli	
	Myron Christodoulides	
	Denise Gonçalves	
	Lílian Bueno	
	Ricardo Fujiwara	
Eduardo Coelho		
Manoel Otávio Costa Rocha		

Ativar c  
Acesse C

**ANEXO B – Patente da Proteína Quimérica M1**

22/12/2023 870230113889  
23:53  
  
29409162312408909

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 027403 0

**Dados do Depositante (71)**

---

**Depositante 1 de 3**

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 17217985000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31270-901

**País:** Brasil

**Telefone:** (31) 3409-6430

**Fax:**

**Email:** [patentes@ctf.ufmg.br](mailto:patentes@ctf.ufmg.br)

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 22/12/2023 às 23:53, Petição 870230113889

**Depositante 2 de 3**

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE CRICIÚMA - FUCRI

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 83661074000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Pessoa Jurídica

**Endereço:** Avenida Universitária, n. 1.105, Bairro Universitário

**Cidade:** Criciúma

**Estado:** SC

**CEP:** 88806-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (48) 343 12606

**Fax:**

**Email:** aditt@unesoc.net

**Depositante 3 de 3**

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FHEMIG

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 19843929000100

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Pessoa Jurídica

**Endereço:** Rodovia Papa João Paulo II, 4001, Serra Verde

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31630-900

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:** delse.nllies@fhemig.mg.gov.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
22/12/2023 às 23:53, Petição 870230113889

## ANEXO C – Patente da Proteína Quimérica M2



23/12/2023 870230113890  
00:24  
29409162312408984

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 027404 8

**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 3

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 17217985000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar- sala 2011

Cidade: Belo Horizonte

Estado: MG

CEP: 31270-901

País: Brasil

Telefone: (31) 3409-6430

Fax:

Email: [patentes@ctit.ufmg.br](mailto:patentes@ctit.ufmg.br)

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
23/12/2023 às 00:24, Petição 870230113890

**Depositante 2 de 3**

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DE CRICIÚMA - FUCRI

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 83661074000104

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Pessoa Jurídica

**Endereço:** Avenida Universitária, n. 1.105, Bairro Universitário

**Cidade:** Criciúma

**Estado:** SC

**CEP:** 88806-000

**País:** BRASIL

**Telefone:** (48) 343 12606

**Fax:**

**Email:** aditt@unesoc.net

**Depositante 3 de 3**

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS - FHEMIG

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 19843929000100

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Pessoa Jurídica

**Endereço:** Rodovia Papa João Paulo II, 4001, Serra Verde

**Cidade:** Belo Horizonte

**Estado:** MG

**CEP:** 31630-900

**País:** BRASIL

**Telefone:**

**Fax:**

**Email:** deise.niles@fhemig.mg.gov.br

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em  
23/12/2023 às 00:24, Petição 870230113890