

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA – UFJF

Rafael Silva Gama

**ANÁLISE INTEGRADA DE MÉTODOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS PARA
DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE E MONITORAMENTO DE CONTATOS
DOMICILIARES**

Juiz de Fora

2017

RAFAEL SILVA GAMA

**ANÁLISE INTEGRADA DE MÉTODOS MOLECULARES E
SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE E
MONITORAMENTO DE CONTATOS DOMICILIARES**

Tese de doutorado do curso de Pós-graduação
em Ciências Biológicas:

Área: Imunologia e Doenças Infecto-
Parasitárias, para obtenção do título de doutor
em Ciências Biológicas:

Área: Imunologia e Doenças Infecto-
Parasitárias.

Orientador: Dr. Raúl Marcel González Garcia

Co-orientador: Dra. Lucia Alves Fraga

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gama, Rafael Silva.

Análise integrada de métodos moleculares e sorológicos para diagnóstico de Hanseníase e monitoramento de contatos domiciliares / Rafael Silva Gama. -- 2017.

120 f. : il.

Orientador: Dr. Raúl Marcel González Garcia

Coorientador: Dra. Lucia Alves Fraga

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Hanseníase. 2. q-PCR. 3. ND-O-LID. 4. LID-1. 5. Análise integrada. I. Garcia, Dr. Raúl Marcel González, orient. II. Fraga, Dra. Lucia Alves, coorient. III. Título.

ANÁLISE INTEGRADA DE MÉTODOS MOLECULARES E SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE E MONITORAMENTO DE CONTATOS DOMICILIARES

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias (DIP).

BANCA EXAMINADORA

Profº. Drº. Raúl Marcel González Garcia
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Profª. Drª. Lúcia Alves de Oliveira Fraga
Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares – UFJF/GV

Profª. Drª Maria Aparecida de Faria Grossi
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ e Faculdade da Saúde e Ecologia Humana - FASEH

Profª. Drª Patrícia Sammarco Rosa
Instituto Lauro de Souza Lima

Profª. Drª. Eveline Gomes Vasconcelos
Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

Profº. Drº. Gilson Costa Macedo
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Dedico este trabalho à minha esposa, que destinou estes quatro anos integralmente a nossa família para possibilitar a realização deste trabalho com sucesso.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu bom Deus e a Nossa Senhora que sempre estiveram ao meu lado, traçando meus caminhos e me cobrindo com suas bênçãos.

As minhas filhas que em todos os momentos me enchem de amor, alegria, paz, força, dedicação, coragem e tudo que há de melhor nesse mundo.

A minha esposa por sempre estar ao meu lado me dando força e sabedoria.

Aos meus pais e irmãos, que fazem de tudo para o meu sucesso e principalmente por estarem sempre em oração por mim e por minha família.

Aos meus orientadores, Dra. Lucia Alves Fraga e Dr. Raúl Marcel González Garcia, que acreditaram no meu potencial para o desenvolvimento deste trabalho e por sua intensa dedicação em minha formação. Sou muito grato por todos os ensinamentos que me repassaram.

Ao meu amigo, Pedro Henrique Ferreira Marçal pela amizade e por compartilhar os momentos fáceis e difíceis dessa caminhada.

Agradeço ao professor Márcio Luiz Moreira Souza pela grande contribuição neste trabalho e pela parceria em todos os outros projetos desenvolvidos.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisa em Imunologia da Universidade Vale do Rio Doce. Agradeço por toda contribuição na minha trajetória acadêmica.

À Dra. Mariane Stefani e Aline, por ter me acolhido no IPTSP – UFG e principalmente por não medir esforços em contribuir com meu projeto.

Ao Dr. Milton Ozório de Moraes e Dra. Euzenir Nunes Sarno – FIOCRUZ/RJ, pelas grandes colaborações durante o meu mestrado e doutorado. Obrigado por me fazer parte deste importante grupo de pesquisa.

À Dra. Ida Maria Foschiani – ILSL, pelas orientações e por abrir novas perspectivas para minha vida acadêmica.

Aos colegas de trabalho da Universidade Vale do Rio Doce – Univale, pela alegria em ver a concretização de mais essa etapa na minha vida.

À equipe de saúde do CREDEN-PES, pelo incentivo e pelo apoio na avaliação dos pacientes, além do auxílio na coleta de dados.

Aos participantes do estudo, que gentilmente cederam amostras biológicas para a realização dos testes.

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG e a UFJF, pelo suporte e fomento ao projeto.
Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O diagnóstico da hanseníase é eminentemente clínico, podendo ser complementado com baciloscopia, histopatologia e testes imunológicos. Métodos bacteriológicos clássicos para identificação de bactérias patogênicas não podem ser aplicados para o diagnóstico de hanseníase, sobretudo pela impossibilidade de cultivo *in vitro* do *M. leprae*. O exame histopatológico e a baciloscopia têm sido utilizados como métodos auxiliares para a classificação clínica dos casos. Técnicas moleculares e sorológicas têm sido avaliadas como ferramentas de diagnóstico na hanseníase. Ao contrário da baciloscopia, que requer cerca de 10^4 organismos por grama de tecido para detecção real, a PCR é uma técnica de alta especificidade e sensibilidade, capaz de detectar 25 fg (10^{-15} g) de DNA de *M. leprae*. Além disso, a possibilidade de sua utilização em quase todos os tipos de amostras clínicas confere a este método um alto potencial para o diagnóstico diferencial. Os testes sorológicos têm como alvo a detecção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* que indicam infecção. Esses testes podem ser úteis no monitoramento da eficácia da terapia, na determinação da prevalência da doença e na avaliação da distribuição da infecção entre contatos domiciliares. Considera-se que o indivíduo que reside ou tenha residido com o doente de hanseníase apresenta maior risco de adoecimento em relação à população em geral, pelo fato de estarem expostos ao *M. leprae*. Familiares de pacientes Multibacilar e Paucibacilar devem ser examinados, independente do tempo de convívio. Sugere-se avaliar anualmente, durante cinco anos, todos os contatos não doentes, quer sejam familiares ou sociais. Neste estudo utilizou-se o suporte da Inteligência Artificial (*Random Forest*) para análise integrada de métodos sorológicos e moleculares, no diagnóstico de novos casos de hanseníase e monitoramento de contatos domiciliares por um período de cinco anos. O estudo foi desenvolvido em Governador Valadares – MG, considerada área endêmica de hanseníase. O desenho proposto é do tipo longitudinal, com coleta de dados cadastrais de todos os casos diagnosticados em 2011 e seus respectivos contatos domiciliares registrados no período de 2011, 2012 e 2016. Um total de 196 indivíduos, sendo 43 casos, 113 contatos domiciliares e 40 indivíduos considerados controles endêmicos que relataram não ter convívio com pacientes com hanseníase nem tão pouco histórico de hanseníase na família foi incluído no estudo. Foram coletadas amostras sangue e de raspado intradérmico dos casos de hanseníase e seus respectivos contatos domiciliares, para análise por qPCR (16S rRNA) e ELISA (anti-NO-O-LID e LID-1). A análise integrada dos dados foi realizada por meio da *Random Forest* com o objetivo de melhorar o desempenho dos testes para o diagnóstico de hanseníase. Isoladamente, a qPCR apresentou sensibilidade de 48,8% e especificidade de 100% no diagnóstico de casos de hanseníase. No ensaio de ELISA anti-ND-O-LID a sensibilidade alcançada foi de 57,9% e especificidade de 97,5%, enquanto que no ensaio de anti-LID-1, a sensibilidade e especificidade foram de 63,2% e 92,5%, respectivamente. Entretanto, a análise integrada dos dados por *Random Forest*, utilizando 10.000 árvores de decisão, com um erro modal de 12,8%, obteve-se uma taxa de sensibilidade de 81,6% e especificidade de 92,5% na predição de novos casos de hanseníase. O modelo de *Random Forest* foi utilizado para o monitoramento de contatos domiciliares no período de 05 anos. Esta ferramenta de análise identificou entre os contatos, 02 doentes, mesmo antes do diagnóstico clínico. Ao final do período de acompanhamento, 03 contatos domiciliares foram notificados como casos novos de hanseníase. Desta forma, o modelo proposto pela análise *Random Forest* permitiu

diagnosticar casos de hanseníase com alta sensibilidade e especificidade e identificar precocemente novos casos entre os contatos domiciliares durante o monitoramento.

Palavras chaves: Hanseníase; q-PCR; ND-O-LID; LID-1; Análise integrada.

ABSTRACT

The diagnosis of leprosy is eminently clinical and may be supplemented with bacilloscopy, histopathology and immunological tests. Classical bacteriological methods for the identification of pathogenic bacteria can not be applied for the diagnosis of leprosy, mainly due to the impossibility of *in vitro* culture of *M. leprae*. Histopathological examination and smear microscopy have been used as auxiliary methods for the clinical classification of cases. Molecular and serological techniques have been evaluated as diagnostic tools in leprosy. Unlike smear microscopy, which requires about 10^4 organisms per gram of tissue for actual detection, PCR is a technique of high specificity and sensitivity, capable of detecting 25 fg (10^{-15} g) of *M. leprae* DNA. In addition, a possibility of its use in almost all types of clinical specimens gives this method a high potential for differential diagnosis. Serological tests are aimed at detecting specific antibodies against *M. leprae* that indicate infection. These tests may be useful in monitoring therapy efficacy, in determining disease prevalence, and in assessing the distribution of infection between household contacts. It is considered that the individual who resides or has lived with the leprosy patient has a higher risk of becoming ill in relation to the general population due to the fact that they are exposed to *M. leprae*. Relatives of patients Multibacillary and Paucibacillary should be examined, regardless of the time of convivality. It is suggested to evaluate annually, for five years, all non-sick contacts, whether family or social. In this study we used the support of Artificial Intelligence (*Random Forest*) for integrated analysis of serological and molecular methods, in the diagnosis of new cases of leprosy and monitoring of household contacts for a period of five years. The study was developed in Governador Valadares - MG, considered an endemic area of leprosy. The proposed design is of the longitudinal type, with the collection of cadastral data of all cases diagnosed in 2011 and their respective household contacts registered in the period of 2011, 2012 and 2016. A total of 196 subjects, including 43 cases, 113 household contacts and 40 individuals considered endemic controls who reported not having lived with patients with leprosy or a history of leprosy in the family were included in the study. Blood samples and intradermal scrapings were collected from leprosy cases and their respective household contacts for analysis by qPCR (16S rRNA) and ELISA (anti-ND-O-LID and LID-1). The integrated analysis of the data was performed through *Random Forest* with the objective of improving the performance of the tests for leprosy diagnosis. In isolation, the qPCR showed sensitivity of 48.8% and specificity of 100% in the diagnosis of leprosy cases. In the anti-ND-O-LID ELISA the sensitivity reached was 57.9% and specificity was 97.5%, whereas in the anti-LID-1 assay the sensitivity and specificity were 63.2% and 92.5%, respectively. However, the integrated analysis of the data by *Random forest*, using 10,000 decision trees, with a modal error of 12.8%, obtained a sensitivity rate of 81.6% and specificity of 92.5% in the prediction of new cases of leprosy. The *Random Forest* model was used to monitor household contacts within a period of 5 years. This analysis tool identified between the contacts, 02 patients, even before the clinical diagnosis. At the end of the follow-up period, 03 household contacts were reported as new cases of leprosy. Thus, the model proposed by the *Random Forest* analysis allowed the diagnosis of leprosy cases with high sensitivity and specificity and early identification of new cases among household contacts during monitoring.

Key-words: Leprosy; q-PCR; ND-O-LID; LID-1; Integrated analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo hipotético de uma árvore de decisão para predição Sadio ou Doente.	33
Figura 2 - Representação esquemática do desenho experimental do estudo.	36
Figura 3 - Curva ROC para avaliação do desempenho da qPCR no diagnóstico da hanseníase.	49
Figura 4 - Correlação linear de Pearson entre os valores de 1/Ct e índice baciloscópico em pacientes do grupo MB.	50
Figura 5 - Comparação dos níveis de DNA de <i>M. leprae</i> em função dos grupos CE, PB e MB.	51
Figura 6 - Comparação dos níveis de DNA de <i>M. leprae</i> em função dos grupos CE, CPB e CMB.	52
Figura 7 - Comparação dos níveis de DNA de <i>M. Leprae</i> nos contatos domiciliares e casos de hanseníase em 2011.	53
Figura 8 - Curva ROC para avaliar ELISA anti ND-O-LID e LID-1	54
Figura 9 - Comparação da resposta de anticorpos específicos para ND-O-LID e LID-1 nos grupos CE, PB, MB e contatos domiciliares em 2011, 2012 e 2016.	55
Figura 10 - Importância das variáveis no modelo de predição por Random Forest.	58
Figura 11 - Curva de convergência do erro de acordo com o número de árvores utilizadas no modelo Random Forest.	59
Figura 12a - Exemplos de árvores de decisão com suas respectivas taxas de erro.	61
Figura 13 - Força de predição definida pelo modelo Doente x Sadio.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplo de uma Matriz de confusão.	34
Tabela 2 - Caracterização dos grupos de estudo quanto à forma clínica e baciloscopia que participaram dos ensaios de qPCR ou ELISA.	38
Tabela 3 - Classificação dos grupos de contatos domiciliares de acordo com a forma clínica do caso e número de indivíduos participantes.	38
Tabela 4 - Distribuição dos casos de hanseníase de acordo com gênero, faixa etária e número de lesões cutâneas.	39
Tabela 5 - Distribuição dos contatos domiciliares de acordo com gênero e faixa etária.	40
Tabela 6 - Sequência dos <i>primers</i> e sonda utilizados na q-PCR.	43
Tabela 7 - Eficiência da baciloscopia e qPCR para detecção de <i>Mycobacterium leprae</i>	50
Tabela 8 - Detecção de DNA de <i>Mycobacterium leprae</i> nos contatos domiciliares de casos de hanseníase em 2011.	51
Tabela 9 - Frequência de contatos domiciliares positivos na qPCR RD em 2011, 2012 e 2016.	53
Tabela 10 – Número e proporção de resultados positivos e negativos para ND-O-LID e LID-1 entre controles endêmicos, casos e contatos domiciliares em 2011, 2012 e 2016.	56
Tabela 11 - Matriz de Confusão para modelo de classificação de Madrid.	57
Tabela 12 - Matriz de Confusão para modelo de classificação operacional – PB x MB	57
Tabela 13 - Matriz de Confusão para modelo de classificação em Doente x Sadio.	58
Tabela 14 - Frequência de resultados positivos utilizando diferentes métodos para diagnóstico de hanseníase PB e MB.	64

LISTA DE SIGLAS

AUC – *Area under the curve*

BCG - Bacilo de Calmette e Guérin

CD11b - *Cluster differentiation 11b*

CD18 – *Cluster differentiation 18*

CD209 – *Cluster differentiation 209*

CD35 – *Cluster differentiation 35*

CD36 - *Cluster differentiation 36*

CE - Controles Endêmicos

CMB - Contato de Multibacilar

CPB - Contato de Paucibacilar

CR1 - Receptor do complemento 1

CR3 - Receptor do complemento 3

CREDEN-PES - Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais – Dr. Alexandre Castelo Branco

CREDESH-UFU - Centro de Referência Nacional em Hanseníase / Dermatologia Sanitária – Universidade Federal de Uberlândia

Ct – *Cycle threshold*

Cutoff - Ponto de corte

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Etileno diamino tetra acetato

ELISA - Enzyme linked immunosorbent assay

FN - Falsos negativos

FP - Falsos positivos

FP - Força de Predição

GEN - Gênero

GM-CSF.... Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

HSP-20 - Proteína do choque térmico

IB - Índice baciloscópio

ID 40 - Identificador 40

IFN- γ – *Interferon gama*

IgA - Imunoglobulina A

IgE - Imunoglobulina E

IgG - Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL-1 - Interleucina 1

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

IL-2 - Interleucina 2

IL-21 - Interleucina 21

IL-22 - Interleucina 22

IL-23 - Interleucina 23

IL-5 - Interleucina 5

LID-1 – *Leprosy IDRI diagnostic-1*

MB - Multibacilar

M-PCR - Reação em cadeia da polimerase multiplex

N - Número de pacientes

ND-O-LID – *Natural disaccharide-octyl- leprosy IDRI diagnostic-1*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PB – Paucibacilar

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico

PGL-1 - Glicolípido fenólico – 1

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões

Q-Amostra = qPCR - em qualquer amostra (Sangue ou Raspado intradérmico)

qPCR RD = qPCR - Raspado intradérmico

qPCR SG = qPCR – Sangue

q-PCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativo

RF - *Random Forest*

RNS - Espécies reativos de nitrogênio

ROC – *Receiver operating characteristic*

ROS - Espécies reativas de oxigênio

RV- Razão de verossimilhança negativo

RV+ - Razão de verossimilhança positivo

Th1 - Linfócitos T auxiliares do tipo 1

Th17 - Linfócitos T auxiliares do tipo 17

Th2 - Linfócitos T auxiliares do tipo 2

TLR – Toll like receptors”

TLR1 - Receptor do tipo toll 1

TLR2 - Receptor do tipo toll 2

TLR4 - Receptor do tipo toll 4

TLR9 - Receptor do tipo toll 9

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TT - Tempo de tratamento

VN - Verdadeiros negativos

VP - Verdadeiros positivos

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Aspectos Epidemiológicos e Transmissão.....	20
1.2 Critérios de Classificação de casos de hanseníase.....	21
1.3 Aspectos Imunológicos na hanseníase.....	21
1.4 Aspectos do Diagnóstico de Hanseníase	23
1.5 Diagnóstico laboratorial molecular e sorológico	24
1.6 Vigilância de contatos: importância dos testes moleculares e sorológicos.....	30
1.7 Aplicação da <i>Random Forest</i> para análise integrada de dados.....	32
2. OBJETIVOS	35
2.1 Geral.....	35
2.2 Específicos	35
3. MATERIAL E MÉTODO	36
3.1 Delineamento do estudo.....	36
3.2 Identificação e perfil dos participantes	36
3.3 Coleta das amostras biológicas	40
3.4 Baciloscopia.....	41
3.5 Comitê de Ética e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	41
3.6 Extração de DNA em amostras de raspado intradérmico	41
3.7 Extração de DNA em amostras de sangue.....	42
3.8 Ensaio de PCR em Tempo Real – qPCR	43
3.9 Testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG α -LID-1 e IgG/IgM α -N-DO-LID.....	44
3.10 Análise Estatística dos dados.....	44

3.10.1 Curva ROC	45
3.10.2 Análise dos Ensaios moleculares (qPCR) e sorológicos anti-LID-1 e anti-ND-O-LID	46
3.10.3 Análise dos dados integrados por meio da <i>Random Forest</i>	46
4 RESULTADOS	48
4.1 Ensaio Molecular - qPCR	48
4.2 Ensaio Sorológicos (ELISA) ND-O-LID e LID-1	54
4.3 Integração dos ensaios Moleculares e Sorológicos - <i>RANDOM FOREST</i>	57
5 DISCUSSÃO	66
6 CONCLUSÃO.....	74
7 PERSPECTIVAS.....	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A – ARTIGO	87
ANEXO A – PARECER DO COMITE DE ÉTICA E PESQUISA - CEP.....	118
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	119

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma infecção granulomatosa crônica que acomete principalmente a pele e nervos periféricos, apresentando diversas manifestações clínicas em decorrência do padrão de resposta imunológica estabelecida frente à infecção pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) (SCOLLARD *et al.*, 2006).

O *M. leprae* foi descrito em 1873 por Gerhard Henrik Armauer Hansen como um bacilo reto ou ligeiramente encurvado que se cora em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem em solução álcool-ácido sendo, portanto, classificado como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (SAMPAIO; RIVITTI, 1998). Este bacilo apresenta tropismo pelas extremidades do corpo, onde a temperatura é menor que 37°C favorecendo o seu metabolismo (HASTINGS *et al.*, 1986). Nos tecidos infectados, os microrganismos aparecem isolados ou em feixes paralelos, dispendo-se em “globias” (SAMPAIO; RIVITTI, 1998).

Trata-se de um parasita intracelular obrigatório infectando, preferencialmente, macrófagos e células de Schwann (HARBOE, 1994). O tropismo específico pelas células de Schwann pode ser explicado pela ligação à laminina 2 que compõe a lâmina basal destas células, sendo esta forma de laminina restrita aos nervos periféricos (RAVUKKANA *et al.*, 1997). O acometimento dos nervos periféricos gera espessamento e, como característica, a perda sensorial e motora. Além disso, os nervos sensoriais e autonômicos também são afetados produzindo hipoestesia (BELL-KROTOSKI; TOMANCIK, 1987).

A infecção dos macrófagos pelo *M. leprae* gera lesões na pele com aspecto de placa, pápula, infiltração difusa e mais raramente nódulos. As lesões podem ser hipopigmentadas ou infiltradas com bordas elevadas, ambas com perda de sensibilidade (AZULAY; AZULAY, 1997).

Uma notável característica do *M. leprae* é a grande quantidade de pseudogenes, ocupando quase a metade de seu cromossomo. A comparação entre o genoma do *M. tuberculosis* e do *M. leprae* revelou diminuição do número de genes no *M. leprae*, apresentando um genoma de 3,27 Megabase (Mb), comparado com o de 4,41 Mb do *M. tuberculosis*. Isto resultou na eliminação de várias vias metabólicas importantes, justificando o seu habitat intracelular, sua lenta taxa de replicação (12 a 21 dias), longo período de incubação e a sua incapacidade de cultivo *in vitro* (COLE *et al.*, 2001; MONOT *et al.*, 2009).

1.1 Aspectos Epidemiológicos e Transmissão

A hanseníase é considerada um problema de saúde pública nos países em que o coeficiente de prevalência anual é maior que 1 caso a cada 10.000 habitantes. É uma doença endêmica em diversos países com baixos índices de desenvolvimento social e econômico, destacando-se a Índia e Brasil, que vem apresentando os maiores números absoluto de casos. Em 2015, um total de 210.758 novos casos de hanseníase foi registrado no mundo. A Índia foi responsável por 127.326 casos de hanseníase e o Brasil apresentando-se em segundo lugar com 26.395 casos novos (WHO, 2016).

Apesar dos esforços dos programas de controle, a transmissão continua ativa e em 2016, o número de casos novos no Brasil foi de 25.218 e seu coeficiente de prevalência anual foi de 1,10 casos por 10.000 habitantes (BRASIL, 2017).

O declínio apresentado na prevalência de hanseníase com a implementação de terapias cada vez mais curtas não foi acompanhado de um declínio da incidência, indicando que a prevalência é um parâmetro inadequado para se avaliar o controle da infecção. A taxa de detecção anual de casos novos de hanseníase por 100.000 habitantes representa um parâmetro mais condizente por refletir a capacidade diagnóstica em função da incidência real (PENNA *et al.*, 2008).

Os mecanismos de transmissão da hanseníase não são completamente definidos. Entretanto, considera-se que a forma de transmissão mais provável ocorre por via aérea superior através do convívio entre pacientes infectados sem tratamento e suscetíveis, a partir de contatos prolongados. Van Beers, Hatta, Klatser (1999) sugeriram que a transmissão do *M. leprae* segue o modelo “pedra no lago”, descrito para tuberculose, onde o bacilo é transmitido em círculos concêntricos ao redor de um paciente com alta carga bacilar e sem tratamento. Características sócio-econômicas, sanitárias precárias além de predisposição genética também parecem desempenhar papel importante no desenvolvimento da doença (FINE *et al.*, 1988; MIRA, 2006).

1.2 Critérios de Classificação de casos de hanseníase

Considerando o amplo espectro de manifestações clínicas em que se apresenta, a hanseníase pode ser classificada segundo suas características clínicas, imunológicas e histopatológicas por três sistemas: O de Madri (1953), Ridley e Jopling (1966) e Operacional (WHO, 1982). No sistema de Madrid consideram-se dois polos estáveis e opostos (Tuberculóide e Virchowiano) e dois grupos instáveis (Indeterminado e Dimorfo). A classificação proposta por Ridley & Jopling é amplamente utilizada em pesquisas e considera a imunidade dentro de um espectro de resistência do hospedeiro. Na forma polar tuberculóide (TT), com baixa carga bacilar, predomina a resposta imune celular com baixa produção de anticorpos. No outro extremo está a forma lepromatosa (LL), com alta carga bacilar, alta produção de anticorpos e reduzida resposta imune celular. Além das formas polares são descritas formas imunologicamente e clinicamente instáveis que são borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatosa (BL) (RIDLEY; JOPLING, 1966). A doença ainda pode se apresentar sob a forma neural pura, sem manifestações cutâneas e escassos bacilos mesmo em biópsias de nervos (JARDIM *et al.*, 2005).

Em 1982 a WHO, visando facilitar a classificação para fins de tratamento, estabeleceu o sistema de classificação Operacional visando definir o esquema de tratamento com poliquimioterapia. A classificação operacional deve ser feita pelos critérios clínicos (história clínica-epidemiológica e exame dermatoneurológico). Os pacientes apresentando até cinco lesões de pele são considerados paucibacilares (PB) e aqueles com seis ou mais lesões são classificados como multibacilares (MB).

A baciloscopia deve ser realizada se disponível e o resultado positivo classifica o caso como MB, porém o resultado negativo não exclui o diagnóstico clínico da hanseníase e também não classifica obrigatoriamente o doente como PB (BRASIL, 2016).

1.3 Aspectos Imunológicos na hanseníase

Ao infectar o organismo humano, o *M. leprae* é reconhecido por diferentes receptores da imunidade inata, caracterizada por ser inespecífica. Na hanseníase, essa resposta imunológica pode ser responsável pela resistência da maioria dos indivíduos ao

desenvolvimento da doença (SAMPAIO *et al.*, 2011; LASTORIA; ABREU, 2014). Os receptores de reconhecimento de padrão (PRR) reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são localizados principalmente na parede celular do *M. leprae*, sendo alguns exemplos: LAM, Lipopolissacarídeos, Manose e PGL-1 (LASTORIA; ABREU, 2014). Dentre os principais PRR se destacam: 1) receptores das proteínas do complemento, CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18), que reconhecem o PGL-1 (TABOURET *et al.*, 2010); 2) os receptores de lectina tipo C (CD209) que reconhecem os LAM (TELES *et al.*, 2013); 3) receptores *scavenger* dos macrófagos (CD36) que se ligam a fosfolípido oxidado da parede celular do *M. leprae* além de outros PRR, como os receptores do tipo Toll (TLRs) (KRUTZIK *et al.*, 2008).

A ativação dos TLRs pode mediar diretamente uma resposta inata por fagocitose inibindo a atividade antimicrobiana bem como desencadear liberação de citocinas (TNF- α , GM-CSF e IL-12) e diferenciação das células dendríticas, possibilitando assim o sistema imune inato contribuir para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (KRUTZIK *et al.*, 2005).

Wong *et al.* (2010) observaram também um alto grau de diferenciação populacional no gene TLR1, sugerindo que as doenças micobacterianas podem ter contribuído para a evolução deste locus. Essas observações relacionadas à longa interação entre humanos e micobactérias sugerem que a modulação da via TLR1 pode ser valiosa no tratamento futuro de doenças micobacterianas.

A resposta imunológica do tipo Th1 é induzida pelo reconhecimento de antígenos da parede do *M. leprae* por meio do TLR2 levando à ativação de macrófagos e induzindo a produção inicial de IL-12 (SOUZA *et al.*, 2007). Outros receptores da família TLR também participam da resistência e susceptibilidade a hanseníase (BAFICA *et al.*, 2005; BOCHUD, 2008; Wong *et al.*, (2010). De acordo com Wong *et al.* (2010), o polimorfismo no gene TLR1 está fortemente relacionado ao aumento na suscetibilidade a hanseníase. O TLR4, liga-se a proteína HSP-20 do *M. leprae* e o polimorfismo neste receptor está correlacionado com o desenvolvimento da forma tuberculóide (BOCHUD *et al.*, 2008). Por outro lado, o receptor TLR9 que se localiza em compartimentos endossômicos intracelular, se liga a dinucleotídeos CpG presentes no DNA micobacteriano (BAFICA *et al.*, 2005). O polimorfismo do gene codificador de TLR9 mostrou estar associado à forma virchowiana (KRUTZIK *et al.*, 2005).

As células dendríticas ativadas produzem citocinas IL-12 ou IL-10 e quimiocinas responsáveis pela determinação da resposta imunológica do tipo Th1 ou Th2 contra o *M.*

leprae. Essa diferença irá determinar a evolução da doença para as formas polares da hanseníase (LASTORIA; ABREU, 2014).

No polo tuberculóide, os bacilos fagocitados induzem a ativação dos macrófagos, resultando na produção das citocinas IL-1, IL-12 e TNF- α , que por sua vez atuam sobre células Th1. Esses linfócitos ativados produzem citocinas tais como IL-2, IFN- γ e TNF- α , responsáveis pela resposta imunológica celular (GOULART; GOULART, 2008; LASTORIA; ABREU, 2014). Macrófagos e linfócitos ativados formam granulomas, com predomínio de linfócitos T CD4⁺ no centro e linfócitos T CD8⁺ na periferia (FOSS, 1999; GOULART; GOULART, 2008). Os macrófagos ativados secretam substâncias com atividade antimicrobiana tais como espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). Surpreendentemente, os bacilos apresentam mecanismos que permitem sua sobrevivência no interior dos macrófagos. Entre esses mecanismos destaca-se a inibição da atividade das ROS pelo PGL-1 e a expressão da enzima superóxido-dismutase que impede a ação das ROS e RNS (ABDEL-HAFEZ; MOHAMED; ABD-ELGHANY, 2010).

No polo virchowiano, destaca-se a ativação de células Th2 com a produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13. As citocinas IL-4, IL-10 e IL-13 estimulam células B e inibem ativação de macrófagos resultando na progressão da infecção (SIELING e MODLIN, 1994; FULCO *et al.*, 2014). Encontram-se elevados títulos de anticorpos IgM, IgG, IgE e IgA contra antígenos do bacilo. Entretanto, essa resposta não é capaz de eliminar os bacilos, permitindo assim a progressão da doença e a disseminação bacilar (BUHRER-SEKULA *et al.*, 2007; LYON, 2016).

Recentemente, têm se dado ênfase à participação de células Th17 na hanseníase. A expressão e liberação de citocinas do padrão Th17 (IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23) estão aumentadas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de contatos assintomáticos ou na borda da lesão de pele de pacientes do pólo tuberculóide quando comparadas a pacientes do polo lepromatoso (SAINI; RAMESH; NATH *et al.*, 2013).

1.4 Aspectos do Diagnóstico de Hanseníase

O diagnóstico da hanseníase é eminentemente clínico, podendo ser complementado com baciloscopia, histopatologia e testes imunológicos (TALHARI *et al.*,

1989). O exame dermatoneurológico dos casos suspeitos deve incluir a palpação de nervos periféricos, mapeamento sensitivo utilizando monofilamento Semmes-Weinstein e teste manual de força muscular. A WHO estabeleceu que a presença de um ou mais sinais cardinais como: I-lesão e/ou área da pele com alteração de sensibilidade; II-lesão de nervo periférico, com ou sem espessamento, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; e III-baciloscopia positiva de esfregaço intradérmico – confirma o diagnóstico de hanseníase (BRASIL, 2010).

O exame baciloscópico avalia a carga bacilar e morfologia dos bacilos. O Ministério da Saúde preconiza realizar raspado intradérmico em quatro sítios, com preferência pela lesão ativa ou com alteração de sensibilidade, além dos lóbulos auriculares e cotovelo contralateral à lesão. Na ausência de lesão, deve-se realizar o raspado intradérmico em ambos os lóbulos e cotovelos (BRASIL, 2010). O índice baciloscópico expressa o número de bacilos em escala logarítmica entre 0 e 6. Já o índice morfológico verifica a viabilidade bacilar (percentual de bacilos íntegros em relação ao total examinados). A técnica é simples e de fácil execução, porém é passível de problemas operacionais (LASTÓRIA; ABREU, 2014; LYON; GROSSI, 2013). É um exame com especificidade próxima de 100%, entretanto, com baixa sensibilidade, uma vez que é positivo em apenas 30% dos doentes (BAPTISTA; SARTORI; TRINO, 2006).

Frequentemente, o exame histopatológico é realizado para confirmar casos clinicamente duvidosos. Além disso, também é utilizado como um dos critérios na classificação espectral de Ridley-Jopling. Pode ser estabelecido de forma definitiva pelo encontro do bacilo de Hansen ou, de forma presuntiva, pela presença de um infiltrado inflamatório com tríplice distribuição: perivascular, perianexial e perineural. A natureza das células inflamatórias varia de acordo com resposta imune do paciente (LYON; GROSSI, 2013; LYON *et al.*, 2016).

1.5 Diagnóstico laboratorial molecular e sorológico

Embora a sorologia e a reação em cadeia da polimerase (PCR) sejam reivindicadas por profissionais de saúde como ferramentas auxiliares, até então estes testes são utilizados exclusivamente em pesquisa, com discreta inserção em alguns serviços de

Referência no Brasil, como por exemplo o Centro de Referência Nacional em Hanseníase / Dermatologia Sanitária - CREDESH-UFU (<http://credesh.hc.ufu.br/>).

Ao contrário da baciloscopia, que requer cerca de 10^4 organismos por grama de tecido para detecção real, a PCR é uma técnica de alta especificidade e sensibilidade, capaz de detectar 25 fg (10^{-15} g) de DNA de *M. leprae*. Além disso, a possibilidade de sua utilização em quase todos os tipos de amostras clínicas confere a este método um alto potencial para o diagnóstico diferencial (KANG *et al.*, 2003; GOULART; GOULART, 2008).

Vários estudos foram realizados envolvendo diferentes sequências e genes alvos para a amplificação do DNA do *M. leprae* pela PCR, a maioria deles realizadas a partir de amostras de biópsia de pele. Assim, sistemas simples e específicos foram utilizados para amplificar regiões gênicas que codificam os antígenos de 36-kDa (KAMPIRAPAP *et al.*, 1998), de 18-kDa (SCOLLARD; GILLIS; WILLIAM., 1998) ou 65-kDa (PLIKAYTIS; GELBER; SHINNICK, 1990), bem como, para sequências repetitivas (RLEP) e o gene codificador da subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA) do *M. leprae* (WOODS; COLE, 1989; MARTINEZ *et al.*, 2011; TURANKAR *et al.*, 2015). De forma a determinar um método mais sensível e específico para a detecção molecular do *M. leprae*, Kang *et al.* (2003) compararam dois sistemas de amplificação: o do gene de 18-kDa e o da sequência repetitiva RLEP. Os resultados mostraram que a PCR para a sequência RLEP é mais sensível se comparada com a PCR para o gene de 18-kDa. Uma explicação para o resultado verificado seria o número de cópias da sequência de RLEP no genoma do *M. leprae*, estimado em pelo menos 28 cópias, o que confere a este alvo uma maior sensibilidade em relação aos genes de cópia única (WOODS; COLE, 1989).

Um estudo realizado por Martinez *et al.* (2011), comparando a sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real (qPCR) na amplificação dos genes *sodA*, 16S rRNA, RLEP e Ag 85B para o diagnóstico diferencial na hanseníase, confirma que o gene RLEP confere maior sensibilidade à técnica. No entanto, o ensaio com o RLEP foi positivo para 4 pacientes com outras doenças dermatológicas. O ensaio com 16S rRNA, embora menos sensível, foi específico para o *M. leprae*. Além disso, Martinez *et al.* (2009) confirmaram a especificidade do Primer 16S rRNA para o *M. leprae* utilizando a técnica da qPCR em outras 9 espécies de *Mycobacterium* incluindo *M. tuberculosis* H37RVV ATCC 27294, *M. marinum* ATCC 927, *M. bovis* BCG ATCC 35734, *M. ulcerans* ATCC 19423, *M. simiae* ATCC 25275, *M. avium* ATCC 25291, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. kansasii* ATCC 35775 e *M. smegmatis* ATCC 14468, além de bactérias de outro gênero como *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12345, e *Escherichia coli* ATCC 25992.

Além dos ensaios moleculares, testes sorológicos têm avançado para auxiliar no diagnóstico da hanseníase. Os testes sorológicos têm como alvo a detecção de anticorpos específicos contra o *M. leprae* que indicam infecção. Esses testes podem ser úteis no monitoramento da eficácia da terapia, na determinação da prevalência da doença e na avaliação da distribuição da infecção em determinada comunidade (BÜHRER-SEKULA *et al.*, 1998; MOURA *et al.*, 2008).

A elucidação da estrutura química do PGL-I, antígeno específico do *M. leprae* em 1981 (HUNTER; BRENNAN, 1981) e caracterização da sua imunogenicidade em 1982 (PAYNE; DRAPER; REES, 1982), proporcionaram avanços na área de sorologia em hanseníase. A molécula do PGL-I é um gludipídeo composta por um trissacarídeo, cujo principal determinante imunogênico é a porção terminal da molécula. Estudos com anticorpos monoclonais demonstraram que a remoção da porção glicídica da molécula levou à perda da capacidade de se ligar a anticorpos enquanto a longa cadeia de ácidos graxos não possui efeito antigênico. Estes e outros resultados indicaram que a porção sacarídea do PGL-I poderia ser aplicada na sorologia da hanseníase. Pela dificuldade em se obter grandes quantidades do PGL-I natural, se avaliou a opção de produção de análogos sintéticos. A porção do açúcar foi sintetizada e acoplada à molécula de albumina bovina (BSA) ligada diretamente ou através de grupos fenil (P) ou octil (O). Os seguintes análogos sintéticos foram produzidos: monossacarídeo ligado à BSA por um braço octil (M-O-BSA) (FUJIWARA *et al.*, 1987), dissacarídeo ligado diretamente à BSA (DBSA) (GIGG *et al.*, 1985), dissacarídeo natural ligado à BSA por um braço octil (ND-O-BSA) (CHATTERJEE *et al.*, 1986) e trissacarídeo natural ligado à BSA por um braço fenólico (NTP-BSA) (FUJIWARA *et al.*, 1987).

Estudos envolvendo o PGL-I utilizam principalmente a técnica de ELISA (BRETT *et al.*, 1986). O baixo custo deste ensaio e os resultados quantitativos tornaram a sorologia anti-PGL-I amplamente utilizada na pesquisa. Além do ELISA, foram desenvolvidos ensaios rápidos anti-PGL-I, como o *Dipstick* (BÜHRER-SEKULA *et al.*, 1998) e ensaios imunocromatográficos de fluxo lateral como por exemplo o ML Flow (BUHRER-SEKULA *et al.*, 2003) e ML ICA, que são testes mais simples que o ELISA e com resultados reprodutíveis, pois dispensam o emprego de equipamentos laboratoriais ou técnico de laboratório especializado (STEFANI *et al.*, 2012).

A utilização da sorologia anti-PGL-I no controle da hanseníase como ferramenta para classificação dos pacientes, monitoramento de terapia, diagnóstico, predição de reações hansênicas, recidiva e busca ativa de casos entre contatos foi estudada por Moura *et al.*, (2008). Segundo os autores, o uso da sorologia anti-PGL-I reduziria o número de pacientes

tratados como MB inadequadamente. Em situações em que testes laboratoriais como a baciloscopia e histopatologia não estão disponíveis, existe uma forte tendência em classificar pacientes como MB.

Na maioria dos pacientes o tratamento reduz os níveis de anticorpos anti-PGL-I e geralmente em 25% a 50% ao ano (CHATURVEDI *et al.*, 1991; CHO *et al.*, 1991; DOUGLAS *et al.*, 1987; KLATSER *et al.*, 1989; ROCHE, 1993; CHO *et al.*, 2001). A redução nos níveis de anticorpos varia amplamente entre os pacientes sendo que pode ser linear e negativar rapidamente ou levar anos após término da terapia (GELBER *et al.*, 1989).

O uso da sorologia anti-PGL-I como ferramenta auxiliar no diagnóstico de reação tipo I ou II durante ou após o tratamento ou na predição de recidiva não se mostrou eficiente, pois níveis semelhantes de anticorpos podem ser encontrados em pacientes com e sem reação e até mesmo na população saudável (STEFANI *et al.*, 1998). Porém, pacientes com altas concentrações de IgM anti-PGL-I no início do tratamento apresentaram um risco maior de desenvolver reação do tipo I. Além disso, na reação pós alta, pacientes com sorologia PGL-I positivo no momento da alta apresentaram chance 10,4 vezes maior de desenvolver reação quando comparados aos pacientes com sorologia negativa (BRITO *et al.*, 2008). Desta forma a sorologia anti-PGL-I pode identificar pacientes para monitoramento e tratamento precoce podendo reduzir o dano neural e a incapacidade (ROCHE; THEUVENET; BRITTON, 1991). Em ensaio clínico para avaliação de novos esquemas terapêuticos para hanseníase, a soropositividade anti-PGL-I mostrou-se importante na predição do risco de recidiva. Apenas um dos nove pacientes diagnosticados como recidiva não tinha sorologia positiva no início do tratamento e era um caso de resistência à droga (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2001).

A alta prevalência de soropositivos para PGL-I entre contatos de pacientes MB evidencia que infecção subclínica com *M. leprae* parece ser comum (DESFORGES *et al.*, 1989; MENZEL *et al.*, 1987; SAAD *et al.*, 1990). A detecção de anticorpos contra o PGL-I identificando contatos infectados sem sinais clínicos aparentes pode ser uma ferramenta auxiliar para os programas de controle da hanseníase. Estudo realizado no Rio de Janeiro/RJ, Brasil verificou benefício da descentralização do atendimento pelo incremento da detecção de novos casos, ampliando a precocidade do diagnóstico e conseqüentemente reduzindo o número de pacientes incapacitados (CUNHA *et al.*, 2007).

Em estudo que avaliou a possibilidade de implementar o uso do teste ML Flow na rotina dos programas de controle de saúde se constatou que o teste poderia reduzir o percentual de erro de classificação e conseqüentemente o tratamento insuficiente diminuindo a necessidade da realização do teste baciloscópico (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2007).

Após a descrição do genoma do *M. leprae* (COLE *et al.*, 2001) vários estudos têm identificado novas proteínas ou peptídeos específicos do *M. leprae* com potencial aplicabilidade no diagnóstico laboratorial da hanseníase (ARÁOZ *et al.*, 2006; DUTHIE *et al.*, 2007; STEFANI, 2008; GELUK *et al.*, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2011; HUNGRIA *et al.*, 2012; SPENCER *et al.*, 2012; QIONG-HUA *et al.*, 2013;). Em geral, os resultados de sorologia empregando proteínas recombinantes do *M. leprae* refletem o espectro imunológico da doença: altos níveis de anticorpos no polo lepromatoso e níveis mais baixos de anticorpos no polo tuberculóide (STEFANI, 2008). Em estudo que avaliou a resposta imune humoral e celular a 33 proteínas recombinantes do *M. leprae*, três destas (ML0405, ML2055, ML2331) foram identificadas como imunogênicas capazes de induzir tanto a resposta imune celular específica em pacientes PB, quanto a resposta humoral pela produção de IgG em pacientes MB (SAMPALIO *et al.*, 2011). Foram encontradas diferenças nos padrões de resposta imunológica a proteínas do *M. leprae* entre populações do Brasil e das Filipinas, porém as proteínas ML0405 e ML2331 foram reconhecidas por pacientes MB dos dois países. A partir desses achados, foi proposta a fusão destas proteínas, gerando um novo composto denominado LID-1 (Leprosy IDRI Diagnostic -1). O LID-1 foi obtido por meio da fusão dos genes *ml0405* e *ml2331* para produzir uma única proteína quimérica com melhor sensibilidade em relação às proteínas originais isoladas (DUTHIE *et al.*, 2007; DUTHIE *et al.*, 2008). A análise da reatividade das imunoglobulinas contra o antígeno LID-1 demonstrou que são principalmente da classe IgG (DUTHIE *et al.*, 2011).

Posteriormente LID-1 e epítomos de PGL-1 foram conjugados para formar LID-NDO garantindo a imunoreatividade das duas proteínas isoladas indicando potencial aplicação no diagnóstico sorológico, principalmente na detecção precoce de casos. Foi constatada a reatividade das classes IgM e IgG (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014b).

Estudo realizado em área hiperendêmica do Brasil indicou uma sensibilidade do LID-1 para o diagnóstico da hanseníase de 89% e especificidade de 42%. A baixa especificidade provavelmente está relacionada à presença de um grande número de indivíduos assintomáticos infectados com o *M. leprae* (SOUZA *et al.*, 2014). Por outro lado, o NDO-LID-1 apresenta especificidade de 85,89% e sensibilidade de 90,6% para MB e apenas 27% para PB (DUTHIE *et al.*, 2014a). Nesse estudo, os autores correlacionaram os resultados de ELISA com o índice bacteriológico e classificação de Ridley-Jopling, uma vez que os pacientes do polo lepromatoso apresentavam respostas mais elevadas, enquanto que naqueles do polo tuberculóide os níveis de anticorpos eram mais baixos. Outros autores já vêm

verificando essa variação de níveis de anticorpos contra antígenos do *M. leprae* de acordo com as formas clínicas (DUTHIE *et al.*, 2011; LOBATO *et al.*, 2011). Acrescenta-se que os casos com elevado IB apresentam altos títulos de IgM anti-PGL-1 (DUTHIE *et al.*, 2014b; GROSSI *et al.*, 2008a; LOBATO *et al.*, 2011), de IgG anti-LID-1 (DUTHIE *et al.*, 2011) e de IgM e IgG anti-NDO-LID1 (DUTHIE *et al.*, 2014a; DUTHIE *et al.*, 2014b).

A detecção de IgM anti-PGL-1 contribui para uma correta classificação dos casos de hanseníase (BRITO *et al.*, 2008; BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2007; GROSSI *et al.*, 2008a) e auxilia na diferenciação entre casos PB e MB (ARAÚJO *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2008; DUTHIE *et al.*, 2008; DUTHIE *et al.*, 2014b; LOBATO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2010; STEFANI *et al.*, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

A reatividade de IgM foi utilizada como instrumento adicional na classificação operacional da hanseníase, em Minas Gerais. A utilização desse ensaio possibilitou modificar a classificação dos casos novos de hanseníase, de forma a reduzir o número de casos tratados como MB e desta forma, contribuiu para redução do uso de medicamentos e número de atendimentos (GROSSI *et al.*, 2008b).

A análise da reatividade de IgG contra o LID-1 também é capaz de auxiliar o diagnóstico e a classificação operacional da hanseníase (DUTHIE *et al.*, 2008; DUTHIE *et al.*, 2011; DUTHIE *et al.*, 2014b) e de IgM e IgG contra o ND-O-LID é capaz de auxiliar na detecção rápida e consistente de hanseníase MB (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014b) e monitoramento desses casos, além de aumentar a sensibilidade e especificidade do teste sorológico anti-PGL-1 (DUTHIE *et al.*, 2014b).

A literatura reforça que o LID-1 pode contribuir para o diagnóstico sorológico da hanseníase MB de forma precoce (DUTHIE *et al.*, 2008; RADA *et al.*, 2012). A reatividade ao LID-1 permite diagnosticar a hanseníase de 6 a 8 meses antes do diagnóstico clínico da doença. Assim, a triagem de anticorpos anti LID-1, seja na população ou em grupos em situação de risco, pode acelerar significativamente o tratamento de casos de hanseníase e, também, reduzir as taxas de transmissão, por diminuir o número de indivíduos que apresentam alta carga bacteriana (DUTHIE *et al.*, 2007).

É importante ressaltar que os testes sorológicos auxiliando na determinação do tipo mais adequado de poliquimioterapia (PQT) (CONTIN *et al.*, 2011; GROSSI *et al.*, 2008a; LOBATO *et al.*, 2011; LYON *et al.*, 2008) contribuem para a redução de possíveis danos subsequentes dos nervos e evolução de incapacidades físicas (LOBATO *et al.*, 2011). Além disso, podem auxiliar a tomada de decisão relacionada ao tratamento, quando o exame de baciloscopia não está disponível, pois há boa concordância entre sorologia e IB

(BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2007; LYON *et al.*, 2008; BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2009; CONTIN *et al.*, 2011; LIMEIRA *et al.*, 2013).

A sorologia pode ser uma medida útil da eficácia do tratamento, visto que parece ocorrer declínio dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 após a poliquimioterapia (PQT) (ZENHA; FERREIRA; FOSS, 2009; LOBATO *et al.*, 2011), bem como redução e desaparecimento de anticorpos contra LID-1 (DUTHIE *et al.*, 2007; RADA *et al.*, 2012) e NDO-LID (DUTHIE *et al.*, 2014b). Destaca-se, que a resposta de IgG contra o LID-1 declina mais rapidamente do que IgM anti-PGL-1 ou anti-NDO-BSA (DUTHIE *et al.*, 2011).

Apesar da redução dos níveis de anticorpos, alguns indivíduos podem persistir com índices elevados após o fim da PQT, o que pode ser justificado pela dificuldade dos macrófagos em eliminar completamente o bacilo morto e/ou seus fragmentos do organismo, mesmo após a conclusão do tratamento em casos MB (JOB *et al.*, 2008).

1.6 Vigilância de contatos: importância dos testes moleculares e sorológicos

Considerando a preocupação do Governo Federal em estabelecer estratégias que garantam o controle da transmissão da hanseníase, o Ministério da Saúde publicou a seguinte nota:

Contatos familiares recentes ou antigos de pacientes MB e PB devem ser examinados, independente do tempo de convívio. Sugere-se avaliar anualmente, durante cinco anos, todos os contatos não doentes, quer sejam familiares ou sociais. Após esse período os contatos devem ser liberados da vigilância, devendo, entretanto, serem esclarecidos quanto à possibilidade de aparecimento, no futuro, de sinais e sintomas sugestivos da hanseníase (BRASIL, 2016).

A vigilância de contatos consiste no exame dermatoneurológico e tem por finalidade o diagnóstico de casos novos entre aqueles que convivem ou conviveram, de forma prolongada com o caso novo de hanseníase diagnosticado, considerado caso índice. Além disso, visa também identificar suas possíveis fontes de infecção, independentemente de qual seja a classificação Operacional do caso índice. Considera-se contato domiciliar aquele que reside ou tenha residido com o doente de hanseníase. Contato social é aquele que convive ou tenha convivido em relações familiares ou não, de forma próxima e prolongada com o caso índice (BRASIL, 2016). Está bem documentado que, pelo fato de estarem expostos ao *M.*

leprae, contatos de casos de hanseníase apresentam maior risco de adoecimento, em relação à população em geral (AMORIM *et al.*, 2016).

A detecção de DNA de *M. leprae* tem sido realizada por diversos grupos de pesquisa, utilizando várias amostras clínicas, como swab nasal, urina, saliva e biópsia de pele (MARTINEZ *et al.*, 2009; ARAÚJO *et al.*, 2012; CALEFFI *et al.*, 2012). Cabral *et al.* (2013) afirmam que a detecção de DNA de *M. leprae* em swab nasal, não é essencial para acompanhamento para exame de contatos domiciliares devido a alta frequência de resultados negativos. Poucos trabalhos descrevem a utilização de amostras de raspado intradérmico no lóbulo da orelha para detecção de DNA do bacilo em contatos domiciliares.

Nos contatos domiciliares, a detecção de DNA de *M. leprae* por PCR em esfregaços nasais não determina se o contato irá progredir para uma doença ativa. As taxas de detecção de DNA em swab nasais nos contatos variam de 1 a 10%, uma vez que depende da forma clínica dos casos índices. As altas taxas de positividade observadas entre indivíduos saudáveis questionam a viabilidade do uso de PCR utilizando swab nasal para prever o risco de desenvolver a doença. Mais recentemente, estudos indicam que, de fato, o risco de progredir para uma doença ativa aumenta se um contato for positivo para PCR no sangue (HACKER *et al.*, 2012; REIS *et al.*, 2013).

É importante ressaltar que a análise da reatividade de anticorpo também pode ser útil para avaliar a exposição ao antígeno e ser utilizada como ferramenta para diagnóstico precoce da hanseníase em contatos domiciliares, pois permite identificar os contatos com um alto risco de desenvolver a doença e indivíduos com infecção subclínica (BÜHRER-SÉKULA *et al.*, 2003; FURINI *et al.*, 2011; LOBATO *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012;).

A soropositividade anti-PGL-1 e a prevalência oculta de hanseníase entre contatos domiciliares e crianças em idade escolar remete à existência de focos de infecção ativa. Sugere-se que o teste sorológico pode funcionar como ferramenta para identificar crianças em idade escolar com um maior risco de desenvolver a hanseníase (BARRETO *et al.*, 2011).

Destaca-se que a reatividade de anticorpo da classe IgM e IgG contra o ND-O-LID permite detectar um número significativo de infectados em estágio precoce (DUTHIE *et al.*, 2014b). Além disso, contatos domiciliares com soropositividade anti-PGL-1 (DOUGLAS *et al.*, 2004; DÜPPRE *et al.*, 2012), anti-LID1 (DUTHIE *et al.*, 2007) e anti-ND-O-LID (CARDOSO *et al.*, 2013; DUTHIE *et al.*, 2014a) apresentam maior risco de desenvolver a hanseníase (CARDOSO *et al.*, 2013; DOUGLAS *et al.*, 2004; DÜPPRE *et al.*, 2012; DUTHIE *et al.*, 2007; DUTHIE *et al.*, 2014a) e que o risco de desenvolver a forma MB é 34,4 vezes maior do que naqueles com resultado de sorologia negativo (DOUGLAS *et al.*, 2004).

A análise sucessiva da reatividade de anticorpos pode ser útil, pois o aumento dos títulos de anticorpos anti-PGL-1 e anti-LID-1 poderia ser utilizado para identificar os contatos domiciliares dos casos de hanseníase que necessitam de um maior monitoramento ou ser um indicador de realização do exame clínico (GOULART; GOULART *et al.*, 2008; ARAÚJO *et al.*, 2012; QIONG-HUA *et al.*, 2013).

O monitoramento dos contatos domiciliares deve ser cuidadosamente realizado, estabelecendo estratégias de intervenção, tal como o tratamento profilático para evitar surgimento de casos novos de hanseníase (BAKKER *et al.*, 2004; DÜPPRE *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2012). Reforça-se que, os contatos domiciliares de casos de hanseníase além de apresentarem infecção subclínica, podem também estar envolvidos ativamente na disseminação e propagação do *M. leprae* para indivíduos suscetíveis em regiões endêmicas, fator preocupante, uma vez que podem estar contribuindo para manutenção da cadeia de transmissão da hanseníase (ARAÚJO *et al.*, 2012).

1.7 Aplicação da *Random Forest* para análise integrada de dados

Métodos multivariados aumentam a probabilidade de detecção de atributos em relação às técnicas baseadas em limiares de parâmetro único (BAKER *et al.*, 2014). Dentre esses métodos, destaca-se a *Random Forest* como um modelo estatístico multivariado baseado na Inteligência Artificial (BREIMAN, 2001).

A Inteligência Artificial possui uma grande quantidade de ferramentas disponíveis para fins de classificação estatística multivariada, que visam o desenvolvimento de algoritmo classificador para elaboração de sistemas de aprendizado capazes de tomar decisões baseadas em experiências acumuladas por meio das soluções bem sucedidas de problemas anteriores. Dentre estas ferramentas destacam-se, árvores de decisão e florestas aleatórias de árvores de decisão (*Random Forest*) (WEISS; KULIKOWSKI, 1991; BREIMAN, 2001; BAKER *et al* 2014).

Uma árvore de decisão utiliza como estratégia a decomposição de um problema maior em sub-problemas mais simples e de forma recursiva, ou seja, um mesmo parâmetro pode ser avaliado diversas vezes considerando diferentes pontos de corte. A construção de uma árvore de decisão baseia-se na escolha de um atributo que servirá para particionar os exemplos em subconjuntos correspondentes a cada valor do atributo. Passam-se então os

exemplos para os subconjuntos de acordo com o valor do atributo escolhido e para cada subconjunto, observa-se se que todos os exemplos pertencem a uma mesma classe. Se isso ocorrer, associa-se essa classe a uma predição. Caso contrário, é escolhido um novo atributo para particionar os exemplos e o processo é repetido até que haja uma homogeneidade das classes dos exemplos de um determinado subconjunto (BREIMAN, 2001).

A figura 1 ilustra a estrutura de uma árvore de decisão hipotética para classificar um indivíduo em sadio ou doente. Começando pelo atributo gene “X” que representa neste modelo a primeira variável utilizada pelo classificador. Se o nível de expressão deste gene for ≤ 100 segue-se pelo ramo da esquerda. Em seguida a expressão do gene “Y” é avaliada. Se o nível de expressão for ≤ 50 , continua-se pelo ramo da esquerda, levando à variável gene “Z”. Caso o nível da expressão desse gene for $>$ que 70 segue-se pelo ramo da direita, chegando à predição de doente. Se a expressão do gene “Z” for ≤ 70 segue-se para o ramo esquerdo e a predição é de sadio. O processo é contínuo até que uma predição seja definida.

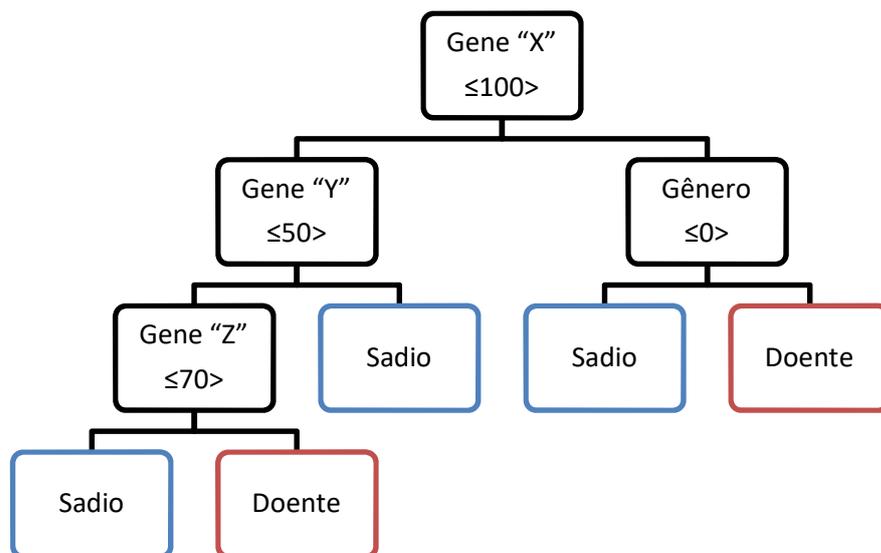


Figura 1 - Exemplo hipotético de uma árvore de decisão para predição Sadio ou Doente.

Atualmente, *Random Forest* é um método em grupo o qual constrói muitas árvores de decisão que serão usadas para classificar um novo exemplo por meio do voto majoritário. Cada árvore de decisão usa um subconjunto de atributos selecionados aleatoriamente a partir do conjunto original, contendo os atributos.

Random Forest apresenta uma série de características que a torna ideal para bases de dados quando há um maior número de atributos que exemplos. Pode ser usada para

problemas de duas classes ou problemas multi-classes e tem um bom desempenho preditivo mesmo quando a maioria das variáveis são ruídos (BREIMAN, 2001).

A aplicação destes modelos permite obter conclusões genéricas sobre um conjunto de exemplos, sendo realizada a partir de um raciocínio baseado em padrões fornecidos por um processo externo ao sistema de aprendizado (MONARD; BARANAUSKAS, 2003). Utilizam-se algumas medidas para avaliar o desempenho do classificador, como por exemplo: taxa de erro, taxa de acerto e AUC (*area under the curve*).

A taxa de erro compara a classe verdadeira de cada exemplo com a classe atribuída pelo classificador (predição). A precisão ou taxa de acerto corresponde ao complemento da taxa de erro ($1 - \text{erro}$). As taxas de erro ou de acerto também podem ser obtidas por meio de uma matriz de confusão (TABELA 1), como apresentado a seguir:

Tabela 1- Exemplo de uma Matriz de confusão.

	Predição Positiva	Predição Negativa
Classe Positiva	100 (VP)	02 (FN)
Classe Negativa	10 (FP)	90 (VN)

Na matriz de confusão, verdadeiros positivos (VP) correspondem ao exemplo que é positivo e foi classificado como positivo; falsos positivos (FP) são os exemplos negativos que foram classificados como positivos; verdadeiros negativos (VN) são os exemplos negativos e que foram classificados como negativos; e falsos negativos (FN) são os exemplos positivos que foram classificados como negativos.

Outra medida de desempenho, denominada AUC (*area under curve*) é obtida por meio de um gráfico de sensibilidade versus especificidade, conhecido como curva ROC (*receiver operating characteristic*) (HAND; TILL, 2001). A sensibilidade da classificação é a razão entre os verdadeiros positivos e o total de exemplos positivos. A especificidade é a razão entre os verdadeiros negativos e o total de exemplos negativos.

A *Random Forest* é uma análise robusta, hábil em construir árvores de classificação com taxas de erros mínimas, favorável ao diagnóstico como, por exemplo, na hanseníase. O suporte da Inteligência Artificial resultou na criação de um modelo de análise integrada de métodos sorológicos e moleculares, que garante maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico da hanseníase. Neste sentido nosso estudo estabeleceu como meta a utilização do modelo proposto, para o monitoramento de contatos domiciliares com uma perspectiva de prever novos casos de hanseníase precocemente.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Propor um modelo de análise integrada de métodos moleculares e sorológicos para diagnóstico de hanseníase e monitoramento de contatos domiciliares.

2.2 Específicos

- 1 - Detectar DNA de *M. leprae* por meio de qPCR e anticorpos anti-N-DO-LID e LID-1 através do ensaio de ELISA em pacientes e seus respectivos contatos domiciliares monitorados por um período de 5 anos.
- 2 - Avaliar o desempenho dos testes moleculares e sorológicos, isoladamente, para auxiliar no diagnóstico da hanseníase;
- 3 - Analisar o emprego da *Random Forest* em três diferentes modelos: I - Identificação de indivíduos doentes ou saudáveis, II – Diagnóstico de casos de acordo com a Classificação Operacional e III - Diagnóstico de casos de acordo com a classificação de Madrid;
- 4 - Avaliar a aplicação do modelo estabelecido para o acompanhamento e diagnóstico de novos casos de hanseníase entre contatos domiciliares no período de 5 anos.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Delineamento do estudo

O desenho proposto é do tipo longitudinal, com coleta de dados cadastrais de todos os casos diagnosticados em 2011 e seus respectivos contatos domiciliares registrados nos anos de 2011, 2012 e 2016. A representação das atividades está esquematizada na Figura 2.

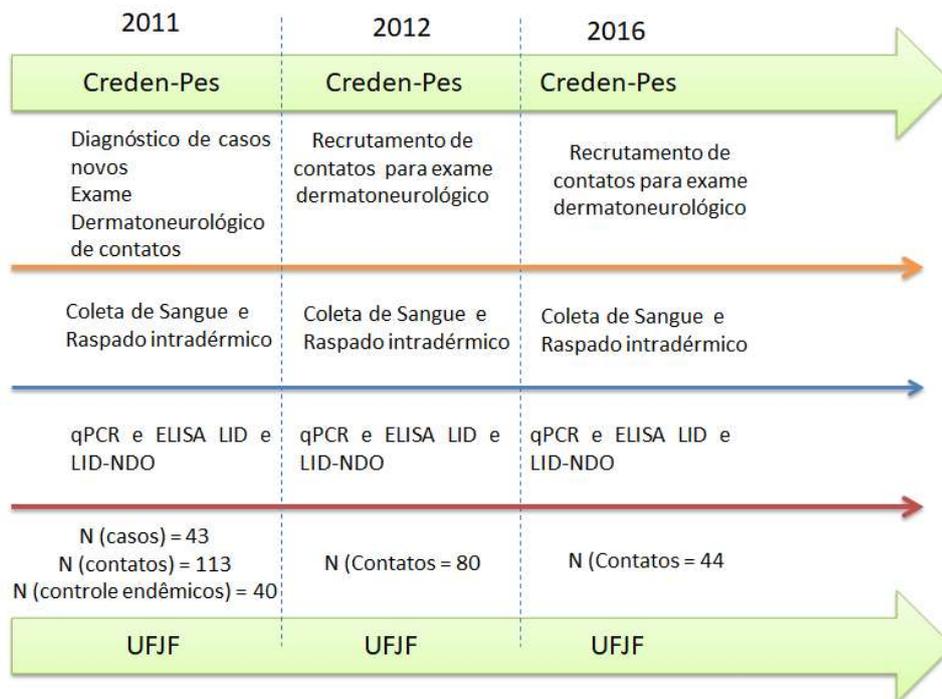


Figura 2 - Representação esquemática do desenho experimental do estudo.

3.2 Identificação e perfil dos participantes

Os participantes do estudo foram atendidos no Centro de Referência em Doenças Endêmicas e Programas Especiais (CREDEN-PES) – Dr. Alexandre Castelo Branco, da Secretaria Municipal de Saúde de Governador Valadares-MG. Estes indivíduos foram

selecionados de acordo com o seguinte critério: Caso Índice de hanseníase (pacientes com hanseníase) e seus respectivos contatos intradomiciliares.

Os casos índices de hanseníase foram diagnosticados em 2011 e as amostras biológicas foram coletadas em até 3 meses após o início do tratamento. Os contatos domiciliares eram indivíduos que convivem ou conviveram com pacientes com hanseníase nos últimos 5 anos e não apresentavam sintomas da doença. Todos os contatos foram submetidos à avaliação clínica criteriosa, por médicos especialistas do CREDEN-PES, antes de serem considerados assintomáticos.

Além disso, aqueles que não apresentavam duas cicatrizes de BCG foram encaminhados para uma segunda dose da vacina. Este procedimento é preconizado pelo Ministério da Saúde na tentativa de estimular uma resposta imune protetora nos contatos assintomáticos (BRASIL, 2002).

Foram incluídos na primeira etapa deste estudo (2011), um total de 196 indivíduos, sendo 43 casos, 113 contatos domiciliares e 40 indivíduos considerados controles endêmicos que relataram não ter convívio com pacientes com hanseníase nem tão pouco histórico de hanseníase na família. Observa-se que, para qPCR foram incluídos os 43 casos, enquanto que para os testes ELISA (anti LID-1 e anti ND-O-LID) em 2011 o número de casos foi reduzido para 38 indivíduos, devido a problemas na qualidade das amostras (hemólise ou soro lipêmico).

Os casos foram agrupados como Paucibacilar (PB) e Multibacilar (MB) (TABELA 2). O grupo PB foi constituído por pacientes que apresentavam a forma clínica Indeterminada ou Tuberculóide, ambos negativos na baciloscopia. Já o grupo MB compreende os pacientes clinicamente classificados como Dimorfo e que apresentaram resultado negativo ou positivo na baciloscopia. Além disso, incluiu-se nesse grupo os pacientes da forma clínica Virchowiana com baciloscopia positiva. Adotou-se a classificação operacional como critério de organização dos grupos pelo fato de que os pacientes atendidos no CREDEN-PES não são classificados segundo os parâmetros de Ridley e Jopling, devido à impossibilidade da realização de testes complementares que atendam a esta classificação.

Tabela 2 - Caracterização dos grupos de estudo quanto à forma clínica e baciloscopia que participaram dos ensaios de qPCR ou ELISA.

.Grupo	Forma Clínica	Baciloscopia	qPCR	ELISA
			N	N
PB	Indeterminada	Negativa	3	3
	Tuberculoide	Negativa	17	14
MB	Dimorfo	Negativa	10	10
		Positiva	4	4
	Virchowiana	Positiva	9	7
Total			43	38
CE	-	-	40	40

N = Número de pacientes; PB = Paucibacilar; MB = Multibacilar; CE = Controles Endêmicos

Os contatos domiciliares foram agrupados e designados como: Contatos de paciente Paucibacilar (CPB), e Contatos de paciente Multibacilar (CMB) totalizando 113 contatos domiciliares em 2011, 80 em 2012 e 44 contatos em 2016 (TABELA 3). A redução do número de indivíduos ao longo do acompanhamento se deve ao fato de mudanças de endereço ou por desistência de retornar para exame clínico e/ou coleta de material.

Tabela 3 - Classificação dos grupos de contatos domiciliares de acordo com a forma clínica do caso e número de indivíduos participantes.

Grupos	2011	2012	2016
	N	N	N
CPB	52	34	23
CMB	61	46	21
Total	113	80	44

N = Número de indivíduos; CPB = Contato de Paucibacilar; CMB = Contato de Multibacilar.

A Tabela 4 apresenta a distribuição dos casos índices de hanseníase de acordo com o grupo, gênero, faixa etária e número de lesões. Nota-se uma distribuição homogênea dos casos quanto ao gênero nos dois os grupos PB e MB. Em relação à faixa etária todos os indivíduos menores de 15 anos participantes deste estudo pertenciam ao grupo PB. Os indivíduos das faixas etária 31 a 45 anos, estavam bem distribuídos entres os 2 grupos. Entretanto, observou-se um maior número de maiores de 45 anos no grupo MB.

Quanto ao número de lesões, todos os pacientes do grupo PB apresentavam menos de 5 lesões na pele, ocorrendo o mesmo com 4 pacientes MB. Enquanto treze indivíduos MB apresentavam mais de 5 lesões.

É importante ressaltar que alguns prontuários médicos ou fichas do SINAM não continham a informação quanto ao número de lesões dos casos índices. Portanto no grupo MB o número de indivíduos ficou reduzido para a variável número de lesões.

Tabela 4 - Distribuição dos casos de hanseníase de acordo com gênero, faixa etária e número de lesões cutâneas.

	PB	MB
	N	N
Gênero		
Masculino	10	14
Feminino	10	9
Faixa etária		
<15	5	0
15-30	5	7
31-45	3	4
>45	7	12
Nº lesões*		
<5	20	4
≥5	0	13

N = Número de pacientes; PB = Paucibacilar; MB = Multinbacilar.

Alguns prontuários médicos não continham o número de lesões dos pacientes, por isso o número de indivíduos ficou reduzido para esta variável.

Os grupos de contatos domiciliares dos casos de hanseníase foram distribuídos quanto ao gênero e faixa etária em 2011 (TABELA 5). Uma diferença no grupo CMB em relação ao CPB foi observada, quanto ao número de indivíduos do sexo masculino. Quanto à faixa etária os contatos domiciliares estavam bem distribuídos nos dois grupos relacionados.

Tabela 5 - Distribuição dos contatos domiciliares de acordo com gênero e faixa etária.

	CPB	CMB
	N	N
Gênero		
Masculino	17	30
Feminino	35	31
Faixa Etária		
<15	11	16
15-30	14	17
31-45	12	13
>45	15	15

N = Número de indivíduos, CPB = Contato de Paucibacilar; CMB = Contato de Multibacilar.

3.3 Coleta das amostras biológicas

Foram coletadas amostras de raspado intradérmico do lóbulo da orelha dos casos e contatos de acordo com o manual de baciloscopia em hanseníase (BRASIL, 2010). Em 2011 e 2012 o raspado intradérmico foi coletado apenas do lóbulo da orelha direita. Em 2016 foram coletados os 4 sítios (orelhas direita e esquerda, cotovelos direito e esquerdo) aumentando a chance de detectar uma infecção subclínica ou mesmo para confirmar ausência de infecção. As amostras foram acondicionadas em tubos de microcentrifuga de 1,5/mL contendo álcool etílico 70% e armazenadas em freezer -20°C até o momento da extração de DNA para o ensaio de qPCR.

Para os testes sorológicos e qPCR no sangue, foram utilizadas amostras de sangue coletadas em tubos sem anticoagulante ou contendo EDTA, respectivamente. Posteriormente, as amostras de soro e sangue total foram aliquotadas em tubos de microcentrifuga de 1,5/ml e estocadas em freezer -20°C até a realização dos experimentos.

3.4 Baciloscopia

Além do material coletado para o ensaio de qPCR, amostras de raspado dérmico dos lóbulos da orelha direita e esquerda, cotovelo direito e lesão foram coletadas dos pacientes diagnosticados com hanseníase para a realização da baciloscopia, dentro da rotina do CREDEN-PES. Naqueles pacientes que não apresentavam lesões, a coleta foi realizada também no cotovelo esquerdo. As amostras foram fixadas e coradas em lâmina pela técnica de Ziehl–Neelsen, que permite a identificação de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Esta técnica foi realizada pela equipe do CREDEN-PES segundo critérios estabelecidos pelo Programa Nacional de Controle da Hanseníase – Ministério da Saúde. O índice baciloscópico (IB) foi proposto por Ridley e Jopling (1962). Este índice é obtido a partir da análise microscópica de 100 campos em cada amostra coletada. Baseia-se em uma escala logarítmica com variação entre 0 a 6. É o método de avaliação quantitativo preconizado e utilizado na leitura da baciloscopia em hanseníase.

3.5 Comitê de Ética e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Univale (CEP), protocolado sob o nº PQ 022/09-009 (ANEXO A). Todos os indivíduos participantes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) antes da participação no estudo. Em caso de menores de 18 anos, a inclusão foi feita após consentimento dos pais ou guardião (ANEXO B).

3.6 Extração de DNA em amostras de raspado intradérmico

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit DNeasy – Qiagen. As amostras de raspado dérmico estocadas em álcool etílico a 70 °GL foram descongeladas em temperatura ambiente e em seguida centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foram adicionados 20 µL de solução de proteinase K (600 mAU/ml), 200 µL de PBS 1X e 200 µL de tampão de lise AL (Qiagen). Em seguida, o

material foi incubado a 56°C por uma hora. Após incubação foram adicionados 200 µL de etanol 96°GL e a solução foi agitada em vórtex por 10 segundos. Todo o material foi transferido para uma coluna DNeasy acoplada a um tubo coletor de 2 ml. Em seguida, centrifugou-se a 6000/g por 1 minuto para eliminação do líquido e retenção de moléculas de DNA e eventualmente proteínas na coluna. O tubo coletor com a solução eluída foi descartado. Outro tubo coletor foi acoplado à coluna DNeasy e adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem AW1 – Quiagen. Novamente a coluna foi centrifugada a 6000/g por 1 minuto. O tubo coletor com o material eluído foi descartado. Logo em seguida, foi adicionado o tampão de lavagem AW2 – Quiagen e um novo tubo coletor adaptado à coluna DNeasy. Centrifugou-se a 20000g por 3 minutos, descartando-se o tubo coletor.

Ao final, a coluna foi acoplada em outro tubo coletor e 100 µL do tampão de eluição AE – Quiagen foram adicionados sobre a mesma. O sistema foi incubado por 1 minuto à temperatura ambiente e em seguida foi realizada uma centrifugação à 6000/g por 1 minuto. Para maior eficiência na obtenção do DNA esta etapa foi repetida. A coluna DNeasy foi descartada obtendo-se DNA no tubo coletor.

A determinação da concentração de DNA no material eluído foi obtida por meio do espectrofotômetro NanoDrop 1000 spectrophotometer – Thermo Scientific. Após a dosagem do DNA o tubo foi congelado a -20°C até o momento do ensaio de qPCR.

3.7 Extração de DNA em amostras de sangue

A extração de DNA nas amostras de sangue coletado em EDTA foi realizada utilizando o kit DNeasy – Qiagen. As amostras estocadas em freezer -20°C foram descongeladas a temperatura ambiente e em seguida homogeneizadas por inversão. Uma alíquota de 50/µL de sangue foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e em seguida foram adicionados 20 µL de solução de proteinase K (600 mAU/ml), 200 µL de PBS 1X e 200 µL de tampão de lise AL (Qiagen). O material foi incubado a 56°C por uma hora.

Os passos seguintes foram os mesmos realizados no protocolo de extração de DNA em amostras de raspado dérmico, descritos acima.

3.8 Ensaio de PCR em Tempo Real – qPCR

A qPCR foi realizada utilizando o sistema de amplificação TaqMan® qPCR. O alvo de amplificação foi a região gênica 16S rRNA específica do *M. leprae*. A sequência dos iniciadores (Primers) e a sequência da sonda que foram utilizadas no ensaio foram descritas por Martinez e colaboradores (2009) e estão apresentadas na Tabela 6:

Tabela 6 - Sequência dos *primers* e sonda utilizados na q-PCR.

Gene	Descrição	Primer / Sonda	Sequência
16S rRNA	16S rRNA	ML16S rRNATaq-F	5`-GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC-3`
		ML16S rRNATaq-F	5`-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT-3`
		ML16SrRNATaq-Sonda	5`-CAT CCT GCA CCG CA-3`

Fonte: Adaptado de Martinez *et al.*, 2009.

O DNA obtido foi descongelado em temperatura ambiente para realização da qPCR em um volume final de 25 µL, contendo TaqMan 2X Master Mix, 20 ng de DNA purificado, 500 nM de cada primer e 500 nM da sonda.

A solução foi preparada em duplicata e submetida à temperatura de 50°C por 2 minutos. Em seguida, à temperatura de 95°C por 10 minutos, e posteriormente 40 ciclos compreendendo a temperatura de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Foi utilizado o termociclador 7000 real-time PCR system (Applied BioSystems, Carlsbad, CA, USA). A fluorescência emitida pela sonda foi analisada pelo software ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). O resultado da qPCR foi dado pelo número de ciclos (Ct) em que a curva de fluorescência acumulada ultrapassa a linha de corte e foram considerados positivos os valores de Ct menores que 38,50, como definido pela curva ROC. O valor de Ct é inversamente proporcional à quantidade de DNA presente na amostra. Entretanto, neste trabalho, o valor de Ct foi convertido para 1/Ct, de modo a se obter uma proporção direta do nível de DNA amplificado na amostra. A linha de corte da fluorescência emitida pela quebra da sonda, foi determinada automaticamente pelo *software*.

3.9 Testes sorológicos para detecção de anticorpos IgG α -LID-1 e IgG/IgM α -N-DO-LID

Anticorpos IgG anti LID-1 (lote: 14 de novembro de 2011) e IgG e IgM anti complexo de fusão ND-O-LID (ND-O-LID-lote: 17 de agosto de 2012) foram detectados por ELISA. Os antígenos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pelo Dr. Malcom S. Duthie (IDRI – EUA), com o apoio do Dra. Mariane M. A. Stefani (IPTSP-UFG).

Placas de 96 poços (Corning Costar, NY, EUA) foram sensibilizadas com LID-1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou ND-O-LID (0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas a 4°C por 12 horas. O bloqueio foi realizado com PBS-Tween 1% BSA. Amostras de soro diluídas 1/200 em PBS-Tween - 10% soro normal de cabra (NGS) foram adicionadas em duplicata e incubadas durante 2 horas à temperatura ambiente.

Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas durante 1 hora com anticorpo de detecção anti-IgG humana conjugada com HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) para sorologia anti-LID-1 e anti-IgG humana (Southern Biotech, Birmingham, AL) acrescentada de anti-IgM humana (Immuno Chemicals, St. Louis, Missouri, EUA) para detecção de anticorpos anti- ND-O-LID. Após a lavagem, as reações foram desenvolvidas utilizando substrato SureBlue TMB (KPL, Gaithersburg, MD, EUA) para revelação da reação colorimétrica e finalizada pela adição de H₂SO₄ 1/N. A densidade óptica foi determinada utilizando leitor de microplacas (Bio-Rad, Life Science, Hercules, CA, EUA) a 450/nm. Para sorologia anti-LID-1 e ND-O-LID, o ponto de corte (*cutoff*) foi determinado pela análise de curva ROC ou *Random Forest*, utilizando amostras de casos de hanseníase e amostras de indivíduos assintomáticos e sem histórico familiar da doença, residentes em Governador Valadares-MG, caracterizados como Controle Endêmico (CE). Os resultados dos testes sorológicos foram expressos como média da absorbância das duplicatas a 450nm.

3.10 Análise Estatística dos dados

Inicialmente os resultados dos testes empregados neste estudo foram analisados separadamente, para verificar a sensibilidade e especificidade de cada um com o intuito de avaliar o seu potencial como diagnóstico da hanseníase. Posteriormente, optou-se para uma análise multivariada, *Random Forest*, com o objetivo de aumentar o potencial dos ensaios

sorológicos e moleculares para serem utilizados como auxílio ao diagnóstico e predição de casos novos de hanseníase.

3.10.1 Curva ROC

A curva ROC (*receiver operating characteristic curve*) foi utilizada para análise dos valores de sensibilidade, especificidade, acurácia – *area under the curve* (AUC), razões de verossimilhança e ponto de corte (*Cutoff*) associado ao menor número de resultados errôneos do teste. As curvas foram obtidas utilizando-se programa estatístico MedCalc Statistical - versão 5.00.020 (www.medcalc.br/index.html). A curva ROC foi estabelecida utilizando dados de todos os casos novos diagnosticados em 2011 e dados dos indivíduos do grupo controle endêmico.

A curva ROC além de indicar a acurácia global dos testes avaliados permitiu identificar com precisão o ponto de corte. Cada ponto do gráfico representa também os índices de sensibilidade e $(100 - \text{especificidade})$ de um ponto de corte estabelecido. Um teste diagnóstico ideal seria aquele cujo ponto de corte estivesse o mais próximo da intercessão sensibilidade/especificidade.

A razão de verossimilhança (*likelihood ratio*) também foi utilizada para avaliação dos testes. A verossimilhança é definida como a razão entre a probabilidade de um determinado resultado de um teste diagnóstico em indivíduos portadores da doença e a probabilidade do mesmo resultado em indivíduos sem a doença. Para um teste dicotômico (positivo/negativo), a razão de verossimilhança é calculada para o resultado positivo e para o resultado negativo. A razão de verossimilhança positivo (RV+) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado positivo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes, e a razão de verossimilhança negativo (RV-) expressa quantas vezes é mais provável encontrar um resultado negativo em pessoas doentes quando comparado com pessoas não doentes (MEDRONHO *et al.*, 2003).

3.10.2 Análise dos Ensaio moleculares (qPCR) e sorológicos anti-LID-1 e anti-ND-O-LID

A análise estatística dos dados obtidos da qPCR foi realizada com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 5.0. A correlação linear de *Pearson* foi utilizada para verificar a relação entre a carga bacilar e níveis de DNA. Os níveis de DNA (qPCR) e os níveis de IgG/IgM (ELISA) entre os grupos foram avaliados pelo teste *Mann Whitney*. O *cutoff*, a sensibilidade, especificidade e acurácia foram avaliados pela curva ROC.

3.10.3 Análise dos dados integrados por meio da *Random Forest*

Foi aplicado o modelo de classificação baseado em inteligência artificial utilizando o *Software R*, gratuitamente disponível em <https://www.r-project.org> (TEAM, 2015). Especificamente, utilizou-se o algoritmo *Random Forest* (RF), também enquadrado como um tipo de *ensemble learning* (aprendizado em bloco), método que gera muitos classificadores e agrega o seu resultado (LIAW; WIENER, 2002). Este método gera múltiplas e aleatórias árvores de decisão que são utilizadas na classificação de novos objetos (no caso, pacientes), com margem de erro pequena e pode prever o desenvolvimento de hanseníase e evolução clínica da doença pelo reconhecimento do padrão de suas variáveis.

Foram testadas diversas variáveis em conjunto a fim de construir um modelo preciso de classificação de hanseníase. Três modelos para predição da doença foram avaliados, tendo como base a classificação de Madrid, classificação Operacional e *status* Doente x Sadio. Variáveis demográficas, moleculares, sorológicas e índice baciloscópico foram incluídas nos modelos. Os resultados de qPCR em amostras de sangue não favoreceram as análises, aumentando consideravelmente o erro na *Random Forest* e desta forma, foram excluídos desta avaliação.

Para obter maior eficiência da *Random Forest* foi realizada uma análise de convergência da taxa de erro considerando o número de árvores. Cada árvore de decisão foi treinada utilizando 70% do número total de casos de hanseníase e de controles endêmicos. Em seguida, o teste foi realizado com os 30% restantes do total de casos e controles endêmicos incluídos para definição de uma predição.

A predição obtida na *Random Forest* foi dada pelo voto majoritário dos classificadores. Ou seja, para predizer que um indivíduo é Doente ou Sadio foram necessários 50% dos votos mais 1 voto. Neste sentido, a probabilidade de acerto na predição (Força de Predição) aumentou a medida que o número de votos se distancia do limiar de 50%. A Força de Predição foi calculada pela seguinte equação:

$$FP = [(n^\circ \text{ de votos}/n^\circ \text{ árvores}) - 0,5] / 0,5$$

Para acompanhamento dos contatos domiciliares a Força de Predição foi estabelecida nos três momentos do estudo da seguinte maneira: Força de Predição baixa (até 0,25) moderada (>0,25 a 0,5), alta (>0,5 a 0,75) e muito alta (acima de 0,75).

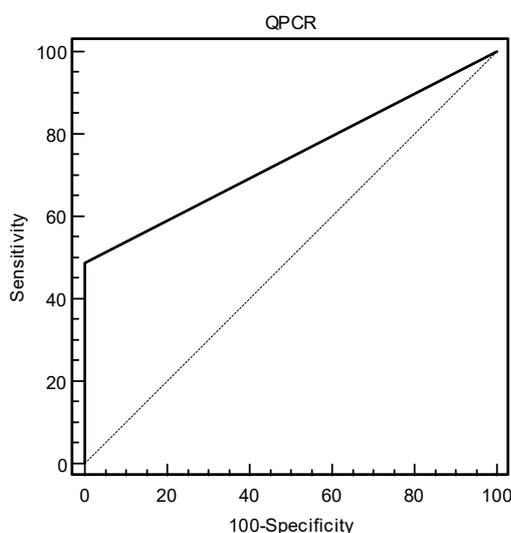
4 RESULTADOS

Ensaio moleculares e sorológicos foram propostos para avaliar a capacidade de predição de casos novos de hanseníase. Neste estudo, os casos de hanseníase foram diagnosticados por exame dermatoneurológico em 2011 e seus respectivos contatos domiciliares foram examinados em 2011, 2012 e 2016. Amostras de sangue e raspado dérmico do lóbulo da orelha foram coletadas para ensaio de qPCR e ELISA neste período. No entanto, em 2012 e 2016 apenas raspado intradérmico foi utilizado na qPCR, pelo fato de que na análise integrada, foi constatado que os resultados provenientes da qPCR no sangue interferiam aumentando a margem de erro na *Random Forest*.

4.1 Ensaio Molecular - qPCR

A presença de DNA de *M. leprae* em amostras de sangue e raspado intradérmico do lóbulo da orelha foi avaliada pela qPCR em 196 indivíduos no ano de 2011, sendo 43 casos de hanseníase, 113 contatos domiciliares e 40 indivíduos considerados controles endêmicos.

A avaliação do desempenho da qPCR no diagnóstico de casos de hanseníase foi realizada através da análise de curva ROC (Figura 3). O valor do cutoff (38,5 Ct) foi determinado pela melhor relação entre sensibilidade (48,8%) e especificidade (100%) na detecção de DNA de *M. leprae* entre os 43 casos clinicamente diagnosticados com hanseníase (PB ou MB) e 40 indivíduos considerados controles endêmicos. A acurácia obtida corresponde a 0,744, indicando um bom desempenho do teste.



Cutoff	Sens. (95% C.I.)	Espec. (95% C.I.)	+LR	-LR	AUC
38,5 Ct	48,8 (33,3- 64,5)	100,0 (100,0-100,0)	1,00	0,51	0,744

Figura 3 - Curva ROC para avaliação do desempenho da qPCR no diagnóstico da hanseníase. Cutoff = ponto de corte ; Ct = número de ciclos; Sens. = Sensibilidade; Espec. Especificidade; C.I. Intervalo de confiança+LR = Razão de verossimilhança positiva; -LR = Razão de verossimilhança negativa; auc=area under the curve=área sobre a curva.

Uma vez avaliado o desempenho da qPCR no diagnóstico da hanseníase, comparamos sua eficiência em relação a baciloscopia, considerando os grupos de casos PB e MB. Observamos que 25% dos pacientes no grupo PB apresentaram DNA de *M. leprae* considerando qualquer amostra (sangue e / ou raspado dérmico). É importante notar que todos os pacientes do grupo PB foram negativos para a baciloscopia. No que se refere ao grupo MB, verificou-se que 69,6% dos pacientes foram positivos na qPCR considerando as duas amostras. Por outro lado, a baciloscopia foi positiva em 56,5% dos pacientes no grupo MB. Entretanto, 30% dos indivíduos MB negativos na baciloscopia, foram positivos na qPCR. Além disso, 100% dos pacientes MB com baciloscopia positiva também foram positivos na qPCR. Em resumo, foi possível identificar DNA de *M. leprae* em 48,8% de todos os casos investigados, enquanto a baciloscopia foi positiva em 30,2% (TABELA 7).

Tabela 7 - Eficiência da baciloscopia e qPCR para detecção de *Mycobacterium leprae*.

Grupos	N	Baciloscopia	qPCR SG	qPCR RD	Q-Amostra
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
PB	20	0 (0,00)	2 (10,0)	4 (20,0)	5 (25,0)
MB	23	13 (56,5)	4 (17,4)	14(60,9)	16 (69,6)
Total	43	13 (30,2)	6 (13,9)	18(41,9)	21 (48,8)

N = número de indivíduos; PB = Paucibacilar; MB = Multibacilar qPCR SG = qPCR Sangue; qPCR RD = qPCR Raspado intradérmico; Q-Amostra = qPCR em qualquer amostra (Sangue ou Raspado intradérmico).

O teste de Pearson foi usado para correlacionar o índice bacilosκόpio (IB) e os níveis de DNA de *M. leprae*, expressos por valores de $1 / Ct$. Observou-se associação significativa ($p = 0,047$, $r = 0,5823$), confirmando que os níveis de DNA bacteriano são diretamente proporcionais ao IB (Figura 4). Nesta análise foram incluídos apenas pacientes do grupo MB que foram positivos para qPCR e baciloscopia.

Uma comparação dos níveis de DNA bacteriano entre os grupos PB e MB foi realizada usando os valores médios de $1 / Ct$ obtidos a partir da qPCR-Q amostra. Observou-se que o nível de DNA de *M. leprae* foi significativamente maior no grupo MB em comparação com o grupo PB (FIGURA 5), conforme esperado.

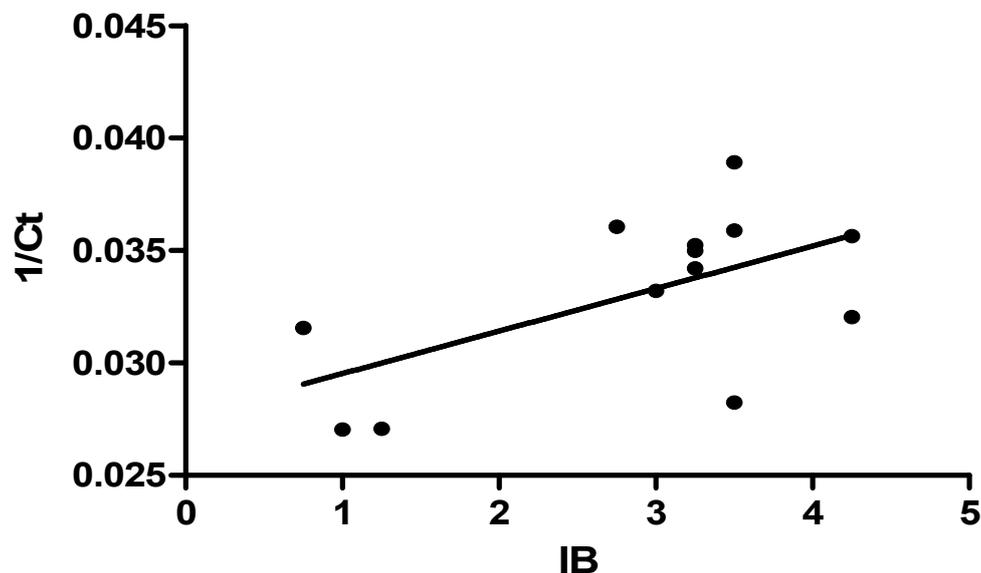


Figura 4 - Correlação linear de Pearson entre os valores de $1/Ct$ e índice bacilosκόpio em pacientes do grupo MB.

IB = Índice Bacilosκόpio; $1/CT$ = Níveis de DNA. $p = 0,047$, $r = 0,5823$.

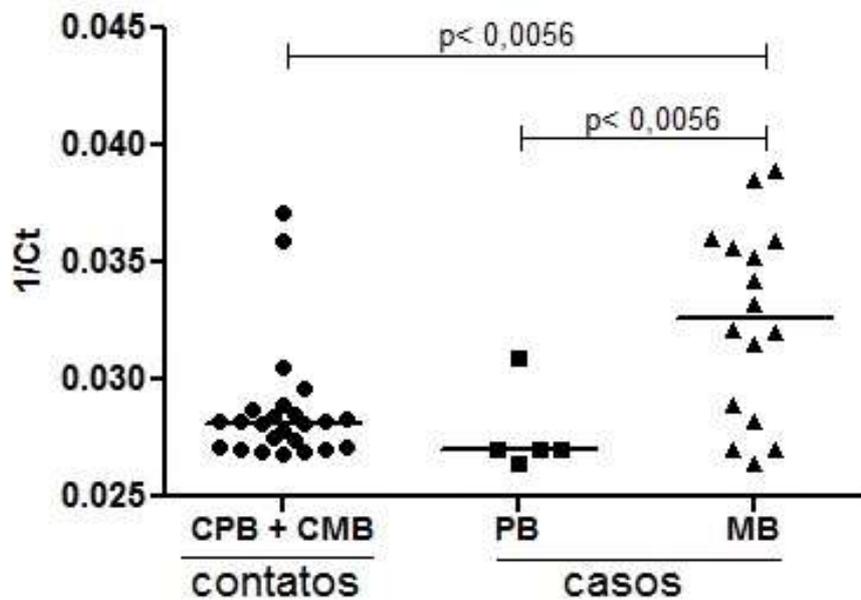


Figura 7 - Comparação dos níveis de DNA de *M. Leprae* nos contatos domiciliares e casos de hanseníase em 2011.

CPB = contato de Paucibacilar, CMB = Contato de Multibacilar, PB = Paucibacilar; MB = Multibacilar; 1/Ct = níveis de DNA. Teste de Mann Whitney.

O acompanhamento de contatos domiciliares quanto a presença de DNA de *M. leprae* foi realizado utilizando apenas amostras de raspado dérmico. Observamos uma redução na frequência de indivíduos positivos, durante o período do estudo, sendo que a frequência de CPB positivos foi de 11,5% em 2011, 3,5% em 2012 e 0% em 2016. O mesmo ocorre com os CMB: 19,7% estavam positivos em 2011, 9,5% em 2012 e 0% em 2016 (TABELA 9).

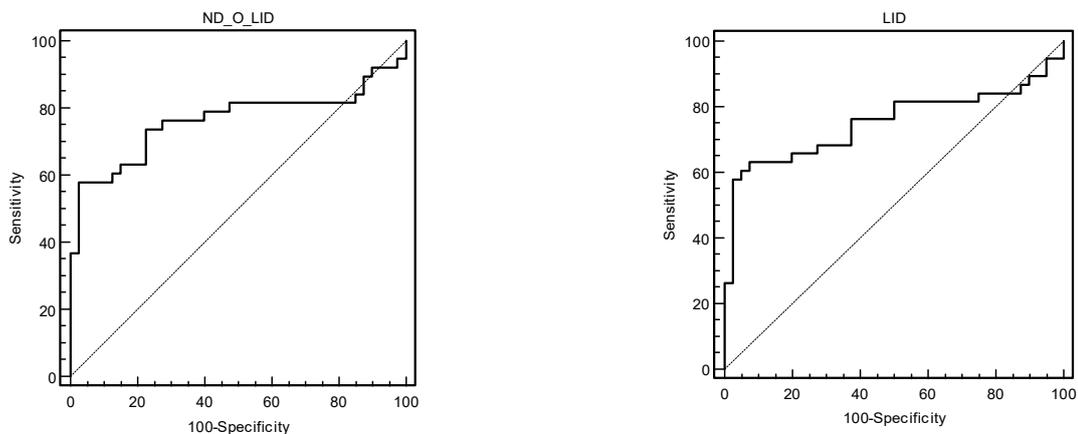
Tabela 9 - Frequência de contatos domiciliares positivos na qPCR RD em 2011, 2012 e 2016.

Grupo	qPCR RD	2011 N (%)	2012 N (%)	2016 N (%)
CPB	Positivo	07 (11,5)	01 (3,5)	0 (0)
	Negativo	45 (88,5)	28 (96,5)	25 (100)
Total		52	29	25
CMB	Positivo	12 (19,7)	04 (9,5)	0 (0)
	Negativo	49 (80,3)	38 (90,5)	21 (100)
Total		61	42	21

qPCR RD = qPCR Raspado intradérmico CPB = Contato de Paucibacilar; CMB = Contato de Multibacilar.

4.2 Ensaio Sorológicos (ELISA) ND-O-LID e LID-1

O ensaio ELISA foi conduzido contra os antígenos ND-O-LID e LID-1, que têm se mostrado como potencial para diagnóstico de hanseníase. Para avaliar o desempenho desses antígenos recombinantes, utilizamos a curva ROC contemplando 43 casos diagnosticados em 2011 e 40 controles endêmicos. No ensaio de ELISA anti-ND-O-LID, para detectar anticorpos IgG e IgM humana, empregando o *cutoff* de 1,0055, obteve-se sensibilidade de 57,9%, especificidade de 97,5%, razão de verossimilhança positiva 23,16, verossimilhança negativa 0,43 e acurácia de 0,763. Paralelamente, o ensaio de ELISA anti LD-1 para detectar anticorpo IgG humana, definindo o valor de *cutoff* 0,4905 apresentou sensibilidade de 63,2%, especificidade de 92,5%, razão de verossimilhança positiva 8,42, verossimilhança negativa 0,40 e acurácia de 0,751 (Figura 8). Não foi observado diferença estatística entre os testes realizados ($p = 0,744$).



Antígeno	Cutoff	Sens. (95% C.I.)	Espec. (95% C.I.)	+LR	-LR	AUC	p
ND-O-LID	1,0055	57,9 (40,8- 73,7)	97,5 (86,8- 99,6)	23,16	0,43	0,763	0,744
LID-1	0,4905	63,2 (46,0- 78,2)	92,5 (79,6- 98,3)	8,42	0,40	0,751	

Figura 8 - Curva ROC para avaliar ELISA anti ND-O-LID e LID-1

Casos x Controles Endêmicos Cutoff = ponto de corte; Sens. = Sensibilidade; Espec. = Especificidade; C.I = Intervalo de Confiança; +LR = Razão de verossimilhança positiva; -LR = Razão de verossimilhança negativa.

Os níveis de anticorpos detectados pelo ensaio ELISA anti-ND-O-LID e LID-1 foram avaliados entre os grupos de controle endêmico, casos PB, casos MB e contatos domiciliares (FIGURA 9). Observamos uma maior produção de anticorpos, tanto para ND-O-LID quanto para LID-1 no grupo MB, conforme esperado. Por outro lado, verificamos

também que o número de contatos positivos para ambos os testes, reduziam ao longo do período de estudo. Estes dados corroboram a análise de qPCR.

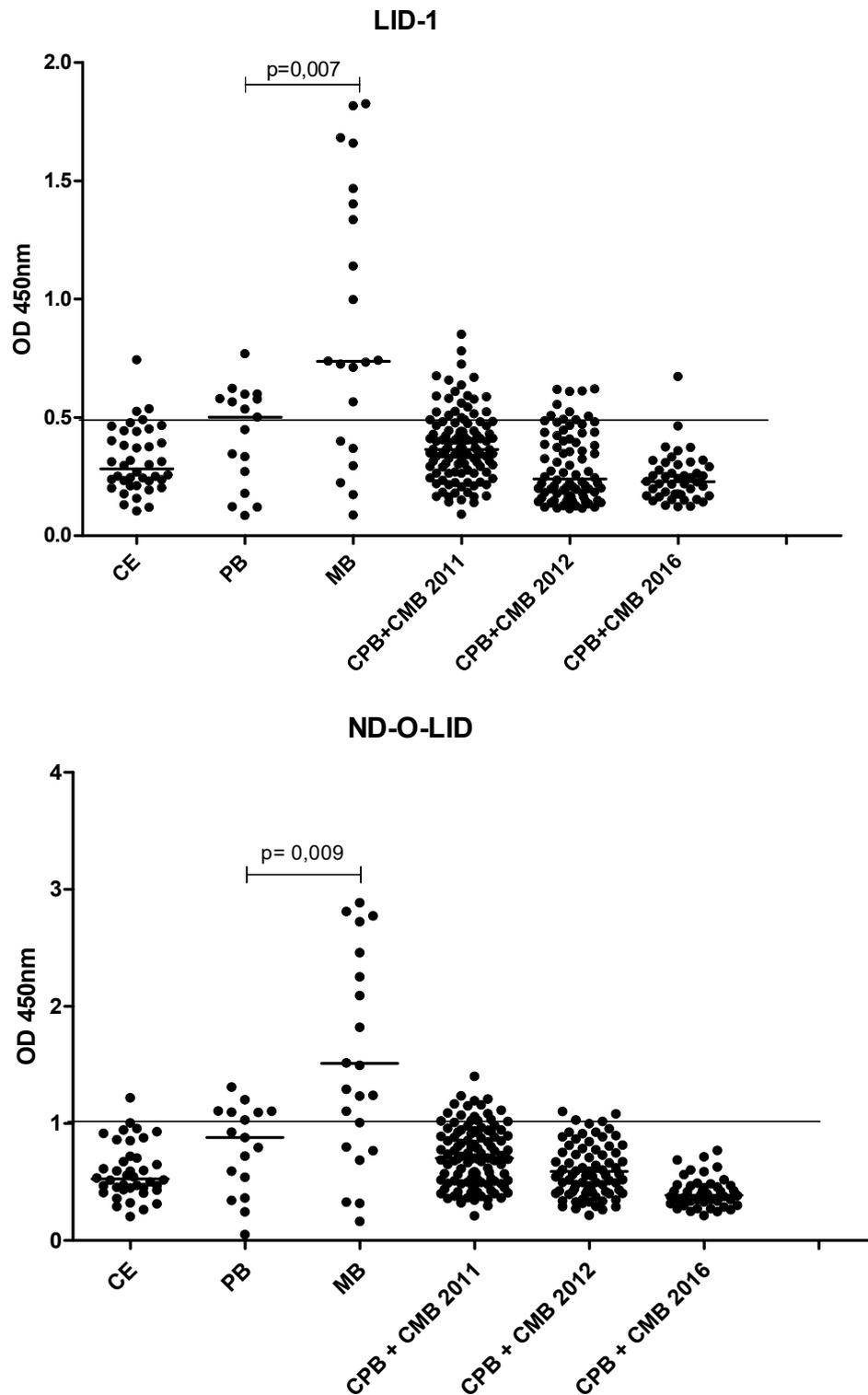


Figura 9 - Comparação da resposta de anticorpos específicos para ND-O-LID e LID-1 nos grupos CE, PB, MB e contatos domiciliares em 2011, 2012 e 2016.

CE = Controle Endêmico, CPB = contato de Paucibacilar, CMB = Contato de Multibacilar, PB = Paucibacilar; MB = Multibacilar

Tabela 10 – Número e proporção de resultados positivos e negativos para ND-O-LID e LID-1 entre controles endêmicos, casos e contatos domiciliares em 2011, 2012 e 2016.

	Antígeno	ND-O-LID			LID-1		
		2011					
Casos	Ano	CE	PB	MB	CE	PB	MB
	Grupo	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	Positivos	2 (5)	7 (41,2)	15 (71,4)	4 (10)	9 (52,9)	15 (71,4)
	Negativos	38 (95)	10 (58,2)	6 (28,6)	36 (90)	8 (47,1)	6 (28,6)
	Total	40	17	21	40	17	21
Contatos	Antígeno	ND-O-LID			LID-1		
	Ano	2011	2012	2016	2011	2012	2016
		n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
	Positivos	18 (15,9)	4 (5)	0 (0)	21 (18,6)	9 (11,3)	1 (2,3)
	Negativos	95 (84,1)	76 (95)	44 (100)	92 (81,4)	71 (88,7)	43 (97,7)
Total	113	80	44	113	80	44	

CE = Controle Endêmico; PB = Paucibacilar; MB = Multibacilar

Para o teste anti-ND-O-LID foram identificados entre os casos de hanseníase uma taxa de positividade de: 41,2% PB e 71,4% MB. Por outro lado, o acompanhamento de contatos revelou uma queda na taxa de positividade no período de estudo. Em 2011 de 15,9% reduziu para 5% no ano de 2012 e em 2016 nenhum contato apresentou positividade. Com relação ao ensaio anti LID-1, observamos um perfil semelhante na frequência de positividade entre os casos, sendo 52,9% PB e 71,4% MB. Embora os resultados entre os testes destacam maior sensibilidade para anti LID-1, consideramos que o anti-ND-O-LID seja mais indicado para auxiliar no diagnóstico da hanseníase por apresentar melhores indicadores de: especificidade, razão de verossimilhança positiva e acurácia, de acordo com a Figura 8. A avaliação de contatos através do ensaio LID-1 também mostrou uma redução na positividade obtida em 2011(18,6%), 2012 (11,2%) e 2016 (2,3%). É interessante notar que o contato que mostrou resultado positivo em 2016 apresentou sintomas suspeitos e está sendo monitorado pelo serviço de saúde (TABELA 10).

4. 3 Integração dos ensaios Moleculares e Sorológicos - *RANDOM FOREST*

O algoritmo *Radom Forest* foi utilizado para possibilitar a integração de ensaios moleculares e sorológicos no diagnóstico de hanseníase. Desta forma, foram propostos três modelos de classificação para predição de hanseníase, tendo como base a classificação de Madrid, classificação Operacional e *status* Doente x Sadio.

Para iniciar a análise, os dados referentes a 70% dos pacientes foram incluídos no sistema para treinamento. Posteriormente, o teste foi validado com os 30% restantes. O resultado dessa análise é apresentado através de matrizes de confusão, destacando a sensibilidade e especificidade de cada modelo (TABELAS 11, 12 e 13). Os modelos que utilizam a classificação de Madrid e classificação operacional apresentaram alta especificidade, porém baixa sensibilidade, especialmente entre as formas clínicas Indeterminada, Tuberculoide, Dimorfa (Madrid) e Paucibacilar (Operacional). Entretanto, o modelo de análise Doente x Sadio apresentou melhores resultados de sensibilidade (81,6%) e especificidade (92,5%) e portanto, foi selecionado para acompanhamento e predição de diagnóstico entre os contatos domiciliares.

Tabela 11 - Matriz de Confusão para modelo de classificação de Madrid.

	IND	TB	DM	VV	SADIO	Sensibilidade	Especificidade
IND	0	1	1	0	1	0	-
TB	0	3	4	0	7	0,214	-
DM	1	2	7	1	3	0,50	-
VV	0	0	2	5	0	0,714	-
SADIO	0	3	0	0	37	-	0,925

IND = Indeterminado; TB = Tuberculóide; DM = Dimorfo; VV = Virchowiano.

Tabela 12 - Matriz de Confusão para modelo de classificação operacional – PB x MB

	MB	PB	SADIO	Sensibilidade	Especificidade
MB	14	5	2	0,677	-
PB	5	5	7	0,294	-
SADIO	0	2	38	-	0,95

MB = Multibacilar; PB = Paucibacilar.

Tabela 13 - Matriz de Confusão para modelo de classificação em Doente x Sadio

	DOENTE	SADIO	Sensibilidade	Especificidade
DOENTE	31	7	0,8158	-
SADIO	3	37	-	0,925

As variáveis definidas para o modelo Doente x Sadio foram: LID-1, ND-O-LID, Tempo de Tratamento, Idade, qPCR RD, Índice Baciloscópico e Genero. O nível de importância de cada variável (FIGURA 10) é definido pela *Random Forest*, durante a avaliação do perfil de casos de hanseníase e controle endêmico. Destaca-se a relevância dos testes LID-1 e ND-O-LID para inclusão no modelo.

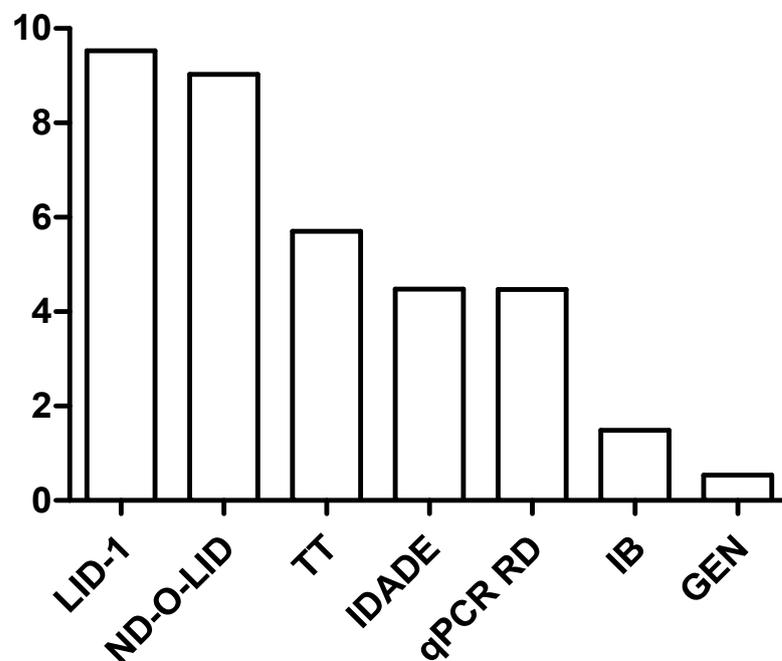


Figura 10 - Importância das variáveis no modelo de predição por Random Forest.
 TT = Tempo de tratamento; qPCR RD = PCR em tempo real utilizando amostras de raspado dérmico; IB = índice baciloscópico; GEN = gênero.

Uma vez selecionado o modelo mais adequado para o nosso estudo, prosseguimos com a otimização do algoritmo. Neste sentido, foi realizada a análise da convergência do erro (FIGURA 11), que definiu a utilização de 10.000 árvores de decisão com diferentes taxas de erro. Estabelecendo assim a moda do erro em 12,8%. As Figuras 12 a,b e c representam exemplos de árvores de decisão incluídas no modelo proposto e suas respectivas taxas de erro.

Observa-se que o padrão de cada árvore de decisão, resultante do treinamento é diferente um do outro. Em cada nó dividido na árvore, uma decisão binária baseada no limiar de um valor da variável é imposta. As decisões impostas em cada nó serão diferentes para cada árvore. Quando não ocorrer nenhuma divisão em um nó uma predição de diagnóstico é definida (Sadio ou Doente).

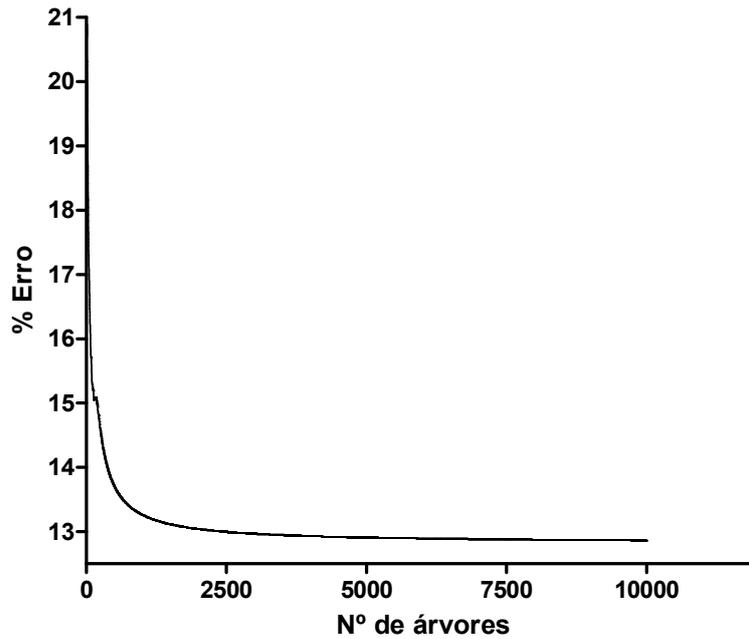


Figura 11 - Curva de convergência do erro de acordo com o número de árvores utilizadas no modelo Random Forest.

a)

Erro: 12,8%

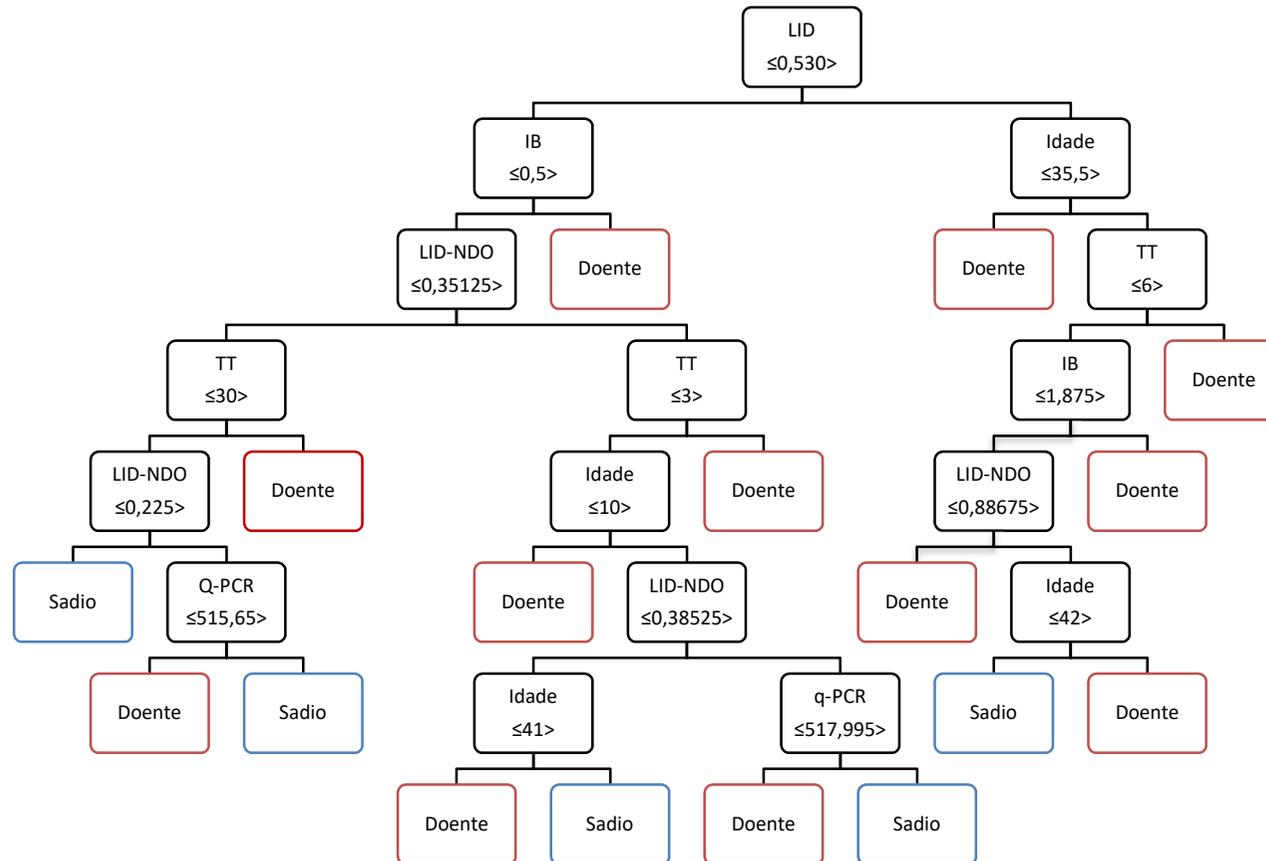


Figura 12a - Exemplos de árvores de decisão com suas respectivas taxas de erro.

b)

Erro: 15,1%

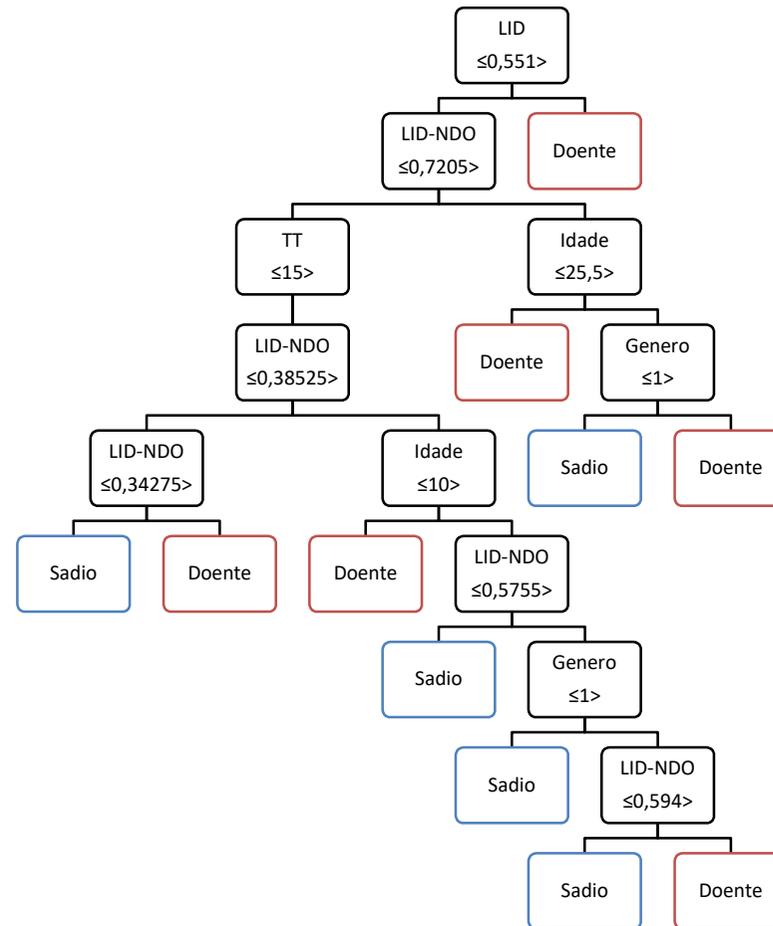


Figura 12b - Exemplos de árvores de decisão com suas respectivas taxas de erro.

c)

Erro: 20,0%

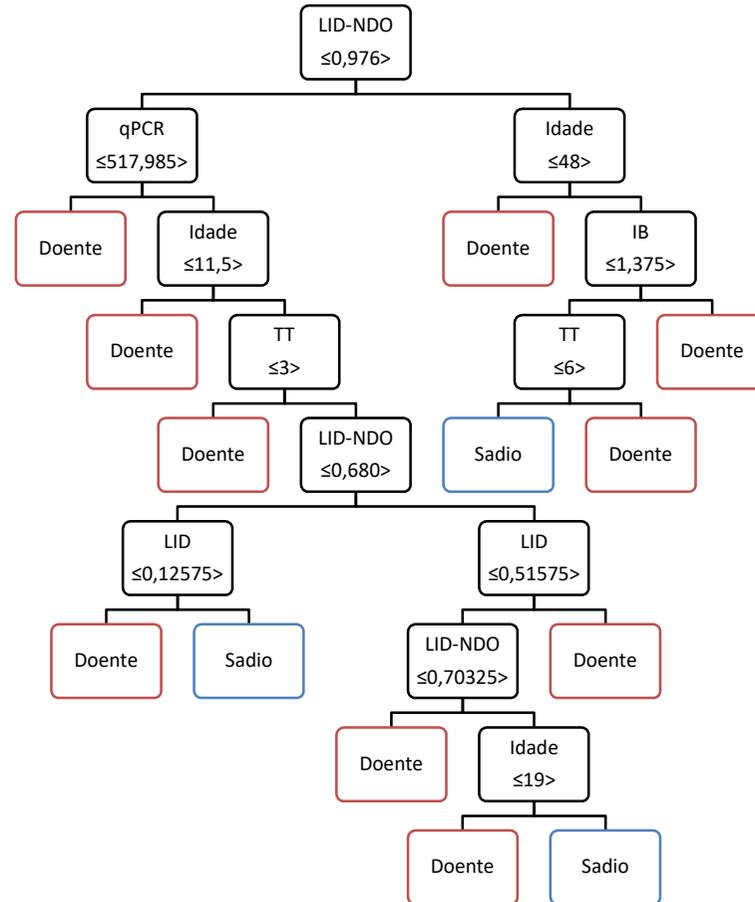


Figura 12c - Exemplos de árvores de decisão com suas respectivas taxas de erro.

Utilizando o modelo Doente x Sadio, comparamos o desempenho da *Random Forest* em relação à Baciloscopia, qPCR RD, ND-O-LID e LID-1 para diagnóstico da hanseníase (Tabela 14). O modelo proposto em nosso estudo se destacou na possibilidade de diagnóstico entre casos MB (90,5%) e principalmente entre PB (70,6%), onde os demais testes avaliados isoladamente não alcançaram a alta taxa de acerto no diagnóstico dado pela *Random Forest*.

Tabela 14 - Frequência de resultados positivos utilizando diferentes métodos para diagnóstico de hanseníase PB e MB.

Classificação Operacional	N	Baciloscopia	qPCR RD	ND-O-LID	LID-1	<i>Random Forest</i>
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
PB	17	0 (0,0)	3 (17,7)	7(41,2)	9(57,9)	12(70,6)
MB	21	11 (52,4)	11(52,4)	15(72,4)	15(72,4)	19(90,5)
Total	38	11 (28,92)	14 (36,8)	22(57,9)	24(63,2)	31(81,6)

A Força de Predição dos contatos domiciliares foi calculada em 2011, 2012 e 2016, para monitoramento e diagnóstico de hanseníase (FIG. 13). Observamos em 2011 que dentre os contatos classificados como doentes, 48,6% apresentavam Força de Predição alta ou muito alta. Esses dados são sugestivos de maior risco de adoecimento, indicando necessidade de acompanhamento desses indivíduos. Em 2012 observamos uma redução do número de indivíduos com Predição Doente, e apenas 02 apresentavam Força de Predição alta ou muito alta. Já em 2016 apenas um indivíduo manteve a classificação Doente e com Força de Predição moderada.

Interessantemente, em 2012, três contatos domiciliares foram diagnosticados através de exame clínico e dois desses indivíduos já haviam sido classificados como Doentes em 2011 pela *Random Forest*. Vale ressaltar que um indivíduo (ID 40) foi classificado como doente em todos os momentos do estudo e atualmente, na avaliação clínica foi solicitado exame histopatológico para confirmação do diagnóstico de hanseníase.

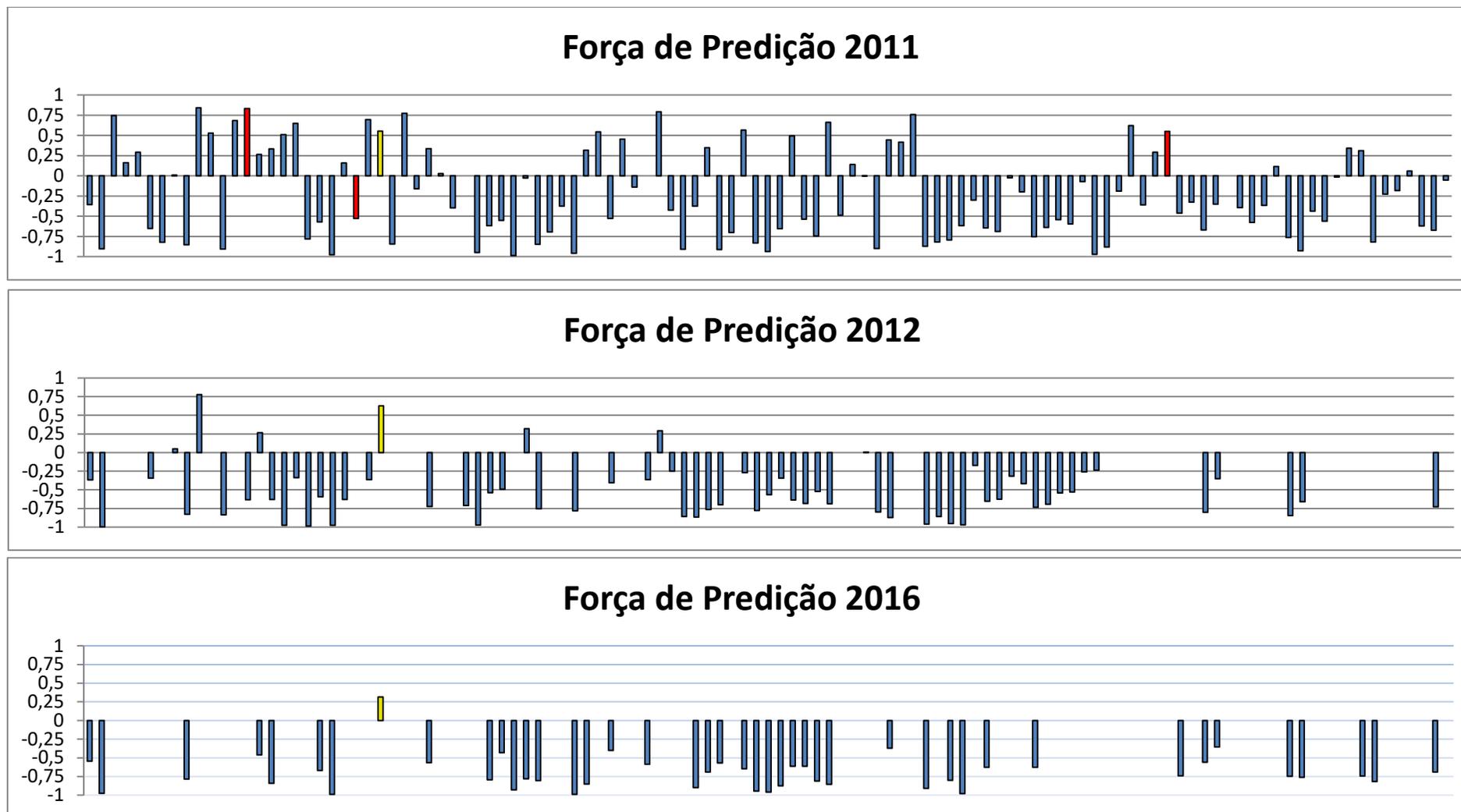


Figura 13 - Força de predição definida pelo modelo Doente x Sadio. Os resultados da força de predição são mostrados no gráfico de barras. Cada barra representa um indivíduo. As cores indicam o status clínico, sendo vermelho um indivíduo clinicamente diagnosticado com hanseníase, azul representa indivíduo saudável e amarelo contato suspeito. O eixo y indica força de predição calculada pela Random Forest, sendo que gráficos positivos indicam doentes e gráficos negativos sadios. A força de predição é representada como a altura da barra em uma escala de -1 a 1.

5 DISCUSSÃO

A detecção precoce da doença é uma estratégia para interromper a transmissão do *M. leprae* e para prevenir a ocorrência de incapacidade física, considerada uma consequência grave. Entretanto, o diagnóstico de hanseníase ainda é essencialmente definido pelo exame clínico e em muitos casos, os sintomas podem ser sutis e muitas vezes não são percebidos mesmo por especialistas. Os exames de baciloscopia e histopatologia são utilizados para auxiliar o diagnóstico clínico e são úteis na categorização espectral e de tratamento (WOROBEC, 2012). Em áreas de maior endemicidade, os testes sorológicos e moleculares vêm sendo realizados e analisados separadamente para o acompanhamento de contatos domiciliares, que apresentam alto risco de desenvolver a doença. No entanto, a precisão desses testes ainda é debatida e muitos grupos estão procurando maneiras simples de torná-los mais confiáveis, especialmente na identificação de casos de hanseníase entre os contatos domiciliares (BANERJEE *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2006; CALEFFI *et al.*, 2012; DUTHIE *et al.*, 2007; CABRAL *et al.*, 2013; AMORIM *et al.*, 2016; FRADE *et al.*, 2017). Nesse sentido, propusemos integrar métodos sorológicos e moleculares para auxiliar no diagnóstico e monitoramento de contatos domiciliares utilizando para análise dos dados, o algoritmo *Random Forest*, como suporte dentro de uma abordagem inovadora da Inteligência Artificial (BREIMAN, 2001; BAKER *et al.*, 2014).

Goulart e Goulart (2008) mostraram que entre diversos marcadores de ácido nucleico para diagnóstico de hanseníase na literatura, três apresentaram maior sensibilidade e especificidade (RLEP, Ag 85B e 16S rRNA). Posteriormente, Martinez *et al.* (2011) demonstraram que o ensaio de qPCR utilizando RLEP poderia ser usado para melhorar a detecção de pacientes devido à sua alta sensibilidade, 100 % para pacientes MB e 84,6 % para pacientes PB. Entretanto, esses autores relataram uma especificidade de apenas 73,3% para o RLEP, uma vez que detectaram resultado positivo em 4 amostras de indivíduos considerados saudáveis. Para justificar tal fato, os autores discutiram a possibilidade de ocorrerem estágios subclínicos de uma infecção pelo *M. leprae* uma vez que a hanseníase apresenta um período de incubação muito longo e a ocorrência dessa bactéria em uma forma dormente dentro de granulomas é passível de existir (CARDOSO *et al.*, 2011). No entanto, os autores afirmam que esses indivíduos foram acompanhados por até 10 anos e não desenvolveram a doença. Os autores concluem que a positividade da qPCR pode de fato indicar a presença de bacilos ou infecções subclínicas, o que não significa, entretanto, que o quadro irá evoluir para doença.

Além disso, existe um questionamento em relação à sequência repetitiva (RLEP) que é altamente conservada e, portanto, muitas sequências homólogas podem estar presentes em outras espécies de *Mycobacterium* no ambiente. Considerando, esse fato, torna-se interessante avaliar um gene de cópia única, como o Ag 85B e o 16S rRNA, que parecem candidatos mais promissores. Em nosso estudo optamos pela amplificação do gene 16S rRNA.

Analisando separadamente os dados da qPCR, confirmamos o seu potencial para detecção de DNA de *M. leprae* em casos de hanseníase com baciloscopia negativa, bem como em contatos domiciliares assintomáticos. Observou-se que 25% de indivíduos PB e 30% de MB, que apresentavam baciloscopia negativa, foram positivos na qPCR. Além disso, 100% dos pacientes MB com baciloscopia positiva, também foram positivos na qPCR (TABELA 7).

Em geral, a avaliação extensiva dos testes de PCR em estudos de campo mostrou que a técnica pode atingir 100% de especificidade, enquanto a sensibilidade varia de 34 a 80% em pacientes PB e mais de 90% em pacientes MB (MARTINEZ, 2014). Nossos dados corroboram estes estudos, uma vez que detectamos a infecção pelo *M. leprae* com uma taxa de sensibilidade e especificidade de 48,8% e 100%, respectivamente.

Por ser um procedimento invasivo, a coleta de amostras de raspado intradérmico, em 2011 e 2012, foi limitada apenas a um sítio específico (lóbulo da orelha direita). Portanto, acreditamos que uma maior frequência de positividade para qPCR poderia ser alcançada se outros locais de coleta pudessem ser utilizados, como é padrão para microscopia de esfregaço (BRASIL, 2010). Além disso, de acordo com Martinez *et al.* (2006), a inibição da amplificação de DNA de *M. leprae* em qPCR pode estar relacionada à alta concentração de DNA genômico humano em relação ao DNA bacteriano. Portanto, esse argumento pode ser considerado em relação a resultados negativos em alguns pacientes do grupo PB. Vale ressaltar que alguns pacientes já estavam recebendo tratamento no momento da coleta de material biológico, o que pode resultar na redução da taxa de positividade para qPCR, de acordo com Banerjee *et al.* (2010).

Foi observada uma correlação positiva moderada ($p = 0,047$; $r = 0,5823$) entre os valores de $1/Ct$ (níveis de DNA) e o índice bacteriano (IB) em pacientes MB, reforçando a associação entre o nível de DNA de *M. leprae* detectado por qPCR e infecção. Verificou-se que o nível mais alto de DNA bacteriano correspondia ao maior valor de IB (Fig. 4) conforme demonstrado por Truman *et al.*, (2008). A evidência de uma correlação positiva entre qPCR e IB, nos levou a comparar os níveis de DNA de *M. leprae* entre os pacientes na tentativa de distinguir os grupos. Encontramos uma diferença significativa no nível de DNA bacteriano em relação ao grupo MB e PB (FIGURA 5). Estudos sobre a transmissão da hanseníase

demonstram que pessoas que convivem com os casos estão expostas a um maior risco de se tornarem doentes (SARNO *et al.*, 2012; SALGADO, BARRETO, 2012). Portanto, uma estratégia efetiva para reduzir a incidência de hanseníase é o monitoramento dos contatos domiciliares e a realização do diagnóstico nos estágios iniciais da doença. Banerjee, *et al.*, 2010 demonstraram uma maior frequência de positividade na M-PCR (PCR multiplex) entre contatos MB (10,9%) em relação aos contatos PB (1,3%). Em nosso estudo, no primeiro momento da avaliação (2011), encontramos maior frequência de qPCR positivo para CMB (27,87%) em comparação com CPB (19,23%). Concordamos com o fato de que os contatos de MB estão expostos a uma carga bacteriana mais elevada o que pode ter ocasionado o aumento na frequência de positividade da qPCR. No entanto, em nosso estudo, não detectamos diferenças significativas nos níveis de DNA obtidos de qPCR entre os grupos de contatos domiciliares (CPB e CMB).

É importante notar que todos os contatos domiciliares foram considerados clinicamente saudáveis. No entanto, 23,89% deles apresentavam DNA bacilar, considerando amostras de sangue ou raspado intradérmico do lóbulo da orelha. Essa elevada taxa de detecção indica uma alta dinâmica de transmissão da hanseníase na comunidade. Sabendo que a hanseníase tem um longo período de incubação e os sintomas são difíceis de detectar nos estágios iniciais da doença, enfatizamos que o monitoramento de contatos com resultados positivos para qPCR é extremamente relevante. Geralmente, cerca de 6 a 8% dos contatos domiciliares desenvolvem sintomas clínicos de hanseníase dentro de dois anos após o diagnóstico do caso índice Ottenhoff (1994). O fato de todos os contatos (CPB+CMB) mostrarem níveis de DNA bacteriano semelhantes ao grupo PB (FIGURA 7) e, no entanto, não apresentarem sintomas clínicos, pode ser explicado pelo lento progresso da doença, sugerindo que alguns desses contatos podem desenvolver hanseníase no futuro. Destaca-se que no primeiro ano de monitoramento dos contatos domiciliares, três novos casos de hanseníase foram notificados, indicando uma taxa de co-prevalência de 2,65%. Destes três, dois indivíduos eram do grupo CMB e um deles foi positivo para qPCR antes mesmo do início dos sintomas clínicos.

O monitoramento dos contatos por um período de cinco anos mostrou uma redução importante na frequência de indivíduos positivos para qPCR. Esse fato reforça que o tratamento dos casos diminui a exposição dos contatos ao bacilo e certamente, a administração da segunda dose de BCG recomendada pelo Ministério da Saúde, ativa o sistema imunológico e favorece a evolução para cura.

Em relação às investigações sorológicas tem se relatado que indivíduos que apresentam resultados positivos são considerados infectados pelo *M. leprae* (FRADE *et al.*, 2017). Entretanto, sabe-se que este bacilo apresenta alta infectividade e baixa patogenicidade, e dessa forma o adoecimento pode não ocorrer nestes indivíduos, mesmo tendo anticorpos específicos para antígenos de *M. leprae* na circulação (HASTINGS *et al.*, 1986). Por outro lado, segundo Araújo *et al.*, 2012, a alta soropositividade na população de uma área endêmica é preocupante, tendo em vista que os indivíduos com infecção subclínica podem ser uma fonte potencial de contaminação para outros.

O monitoramento sorológico dos contatos domiciliares revelou um decaimento na produção de anticorpos anti-LID-1 e anti-ND-O-LID em acordo com os resultados da qPCR.

Em 2011, considerando o *cutoff* obtido na curva ROC, identificamos 18,6% e 15,9% de contatos positivos para LID-1 e ND-O-LID, respectivamente. Entretanto, em 2016 constatamos uma redução na taxa de positividade para LID-1 (2,3%) e ND-O-LID (0%). A aplicação de LID-1 para a detecção de casos até um ano antes do reconhecimento de lesões já foi relatada, entretanto, essa observação ainda não foi demonstrada formalmente para o LID-NDO (DUTHIE *et al.*, 2007).

É importante enfatizar que um estudo longitudinal recentemente realizado por Amorim *et al.* (2016), em Mossoró, área hiperendêmica para hanseníase, mostrou que 3,6% dos contatos domiciliares foram diagnosticados com hanseníase, apresentando resultados positivos nos testes sorológicos.

Segundo Frade *et al.* (2017) o ensaio sorológico utilizando o teste rápido comercial NDO-LID (Orange Life, Rio de Janeiro, Brasil) mostrou-se positivo em 62,8% dos pacientes clinicamente diagnosticados com hanseníase. Entretanto, este teste rápido apresentou menor especificidade do que o ELISA anti-PGL-I e anti-LID-1. De acordo com os autores, apesar do referido teste ser capaz de identificar as respostas dominantes tanto ao glicolípido (IgM anti-PGL-I) como à proteína (IgG anti-LID-1), o NDO-LID tem a mesma limitação que outros testes rápidos para diagnóstico, realçando dificuldade deste teste em monitorar indivíduos em estágios iniciais da doença e/ou PB. Independentemente desses achados, a utilização dos testes sorológicos em conjunto, associados ao exame clínico, pode contribuir para a detecção e tratamento precoce de casos de hanseníase.

Em nosso estudo também observamos menor taxa de positividade na sorologia de casos na forma clínica Indeterminada/Tuberculoide (PB). Esse fato pode ser explicado pelo predomínio da resposta imune celular nestes pacientes, em detrimento da resposta humoral que é dada pela produção de anticorpos (RIDLEY; JOPLING, 1966).

De um modo geral, os testes sorológicos apresentam melhor desempenho na identificação de pacientes MB, especialmente nas formas Borderline lepromatoso (BL) e Lepromatoso Lepromatoso (LL). Muitos estudos mostraram que pacientes BL e LL produzem títulos elevados de IgM contra PGL-I, enquanto os pacientes TT apresentam baixos níveis de anticorpos específicos (MOURA *et al.*, 2008).

Vários relatos na literatura indicam que aumentos substanciais nos títulos para anti-LID-1 são indicadores importantes de progressão, mesmo na ausência de lesões cutâneas ou danos nos nervos (DUTHIE *et a.* 2007; SPENCER; BRENNAN, 2011; SPENCER *et al.*, 2012). Em indivíduos saudáveis, um alto título anti-PGL-I e anti-LID-1 sugere que há uma carga bacilar não detectável, que estimula a resposta a este antígeno. Os contatos domiciliares que demonstrem aumentos substanciais no título contra LID-1 e/ou PGL-I devem ser monitorados de perto (BAZAN-FURINI *et al.*, 2011; BRASIL *et al.*, 2003). Daí a importância do monitoramento de contatos domiciliares realizado em nosso estudo.

De um modo geral têm se observado altas taxas de prevalência oculta em áreas endêmicas para hanseníase. Um estudo realizado por Frade *et al.*, 2017, revelou alta porcentagem de positividade nos testes sorológicos anti-LID-1, anti-ND-O-LID e anti-PGL-1, refletindo uma situação de prevalência oculta com muitos focos de infecção no município investigado.

Segundo Morais *et al.* (2012), a estimativa da prevalência oculta da hanseníase no município de Teófilo Otoni, MG atingiu um valor de 526 casos não diagnosticados no período de 2001 a 2010, representando um acréscimo de 67,4% na prevalência registrada. Esses dados reforçam a necessidade do emprego de novas metodologia para o diagnóstico e controle da cadeia de transmissão da doença.

Além da importância do diagnóstico precoce, uma abordagem sistemática e qualificada para monitorar os contatos domiciliares é considerada essencial para interromper a cadeia de transmissão de *M. leprae* (CORRÊA *et al.*, 2012). Dentro desse contexto, adotamos em nosso estudo uma análise em conjunto dos testes sorológicos e moleculares, uma vez que a análise isolada destes métodos não permitiria chegar a uma predição segura.

Sabe-se que métodos multivariados proporcionam uma melhoria de probabilidade de detecção em relação às técnicas baseadas em limiares de parâmetro único. Destaca-se o algoritmo *Random Forest* por ser uma análise inovadora e robusta, que permite realizar predição de diagnóstico, com grande acurácia (BREIMAN, 2001; BAKER *et al.*, 2014).

Em nosso estudo optamos pela análise *Random Forest* como algoritmo de classificação para auxiliar no diagnóstico e monitoramento de contatos. Dentre os modelos de

classificação estudados, o que apresentou menor erro modal (12,8%) foi obtido a partir da matriz de confusão entre “Sadio X Doente”, com sensibilidade de 81,58% e especificidade de 92,50%. Por outro lado, os modelos propostos de acordo com a classificação Operacional e de Madrid, apresentaram baixas taxas de sensibilidade.

Dentre as variáveis utilizadas no modelo selecionado, constatou-se que os ensaios sorológicos (ELISA anti-LID-1 e anti-ND-O-LID) apresentaram maior peso para a predição. O tempo de tratamento, a idade e qPCR-RD exibiram pesos semelhantes na análise. Já o índice baciloscópio e gênero apresentaram os menores pesos.

A análise *Random Forest* tem sido explorada em várias áreas do conhecimento (BAKER *et al.*, 2014). Izmirlian (2004), discute a importância da aplicação desta análise para estudos de proteômica em câncer. O algoritmo permite a classificação clínica do indivíduo de acordo com suas características moleculares referentes à expressão gênica.

Em estudos de epidemiologia molecular vários métodos de classificação têm sido utilizados. Segundo Schwender *et al.* (2004), as classificações aplicadas de modo duplo cego apresentaram uma taxa de erro ligeiramente menor do que uma classificação aleatória. Os autores sugerem que os dados de SNP (polimorfismo de um único nucleotídeo) podem ser úteis para classificação de indivíduos em categorias de alto ou baixo risco de adoecimento.

Em um estudo de avaliação da expressão gênica por meio de Microarranjo Díaz-Uriarte; Andrés (2006) demonstraram que o desempenho preditivo da *Random Forest* é superior a outros métodos alternativos, quando se compara taxas de erros.

Martinez *et al.*, 2011, utilizando modelo mais simples para classificação - árvore de decisão - definiram *cutoff* para valores de Ct na qPCR, identificando infecção de *M. leprae* em amostras biológicas avaliadas para os genes RLEP, Ag +85B, sodA e 16S rRNA. Verificaram que ensaios com maiores valores de *cutoff* apresentaram menor sensibilidade do que aqueles com baixo corte. Entretanto, estes com menor ponto de corte apresentaram diminuição em sua especificidade.

Mais recentemente, a *Random Forest* foi utilizada para comparação de assinaturas moleculares de várias doenças cutâneas, dentre elas a hanseníase (INKELES *et al.* 2015). Neste estudo, avaliando a expressão gênica por meio de microarranjos, os autores obtiveram uma taxa de erro global de 4,5% para diferenciar hanseníase, psoríase, dermatite atópica ou pele normal. O desempenho para cada doença foi avaliado por sensibilidade, especificidade e precisão. Interessantemente, neste estudo um paciente foi clinicamente diagnosticado com dermatite atópica, mas a predição de *Random Forest* foi de psoríase. No entanto, mais tarde o paciente desenvolveu placas inflamatórias na parte inferior das costas, que foram clinicamente

diagnosticadas como psoríase. Desta forma, o classificador molecular previu corretamente o diagnóstico à medida que o curso clínico evoluiu.

Nosso trabalho é o primeiro a discutir e estabelecer a predição de hanseníase por esta abordagem. Não foi encontrado na literatura nenhum estudo com um tema semelhante ao aqui proposto, configurando, portanto, um estudo inédito. Pela primeira vez, realiza-se uma análise integrada de métodos moleculares (qPCR) e sorológicos (ELISA anti LID-1 e ND-O-LID) por meio da *Random Forest* para predição de casos novos de hanseníase entre contatos domiciliares.

É importante ressaltar que de um modo geral as análises de dados sorológicos privilegiam uma comparação entre contatos e/ou sadios com pacientes MB, que de fato são os que produzem altos títulos de anticorpos e com isso são obtidas altas taxas de sensibilidade e especificidade para os testes realizados, em detrimento dos casos PB. Além disso, deve-se considerar que as manifestações clínicas são mais evidentes na forma MB.

Nesse sentido, a sensibilidade dos testes sorológicos anti-PGL-1, anti-LID-1 e anti ND-O-LID apresentam uma ampla taxa de variação, como demonstrado por Frade *et al.* (2017), em que os valores foram respectivamente de 57,9% (MB) e 40% (PB); 47,4% (MB) e 60% (PB); 65,8% (MB) e 40% (PB). Com relação a especificidade os autores encontram valores menores que 75% para os três testes realizados.

Fabri *et al.* (2015), detectaram taxa de positividade de 66,7% (MB) e 33,3% (PB); 89,5% (MB) e 10,4% (PB); 71,7% (MB) e 28,3% (PB) para os respectivos testes sorológicos anti-PGL-1, anti-LID-1 e anti ND-O-LID.

Além disso, Amorim *et al.* (2016), relataram altas taxas de sensibilidade para MB no ensaio de ELISA anti-LID-1(88%) e anti-ND-O-LID (65%). Entretanto, as taxas de sensibilidade foram extremamente baixas para os casos PB nos ensaios anti-LID (16%) e anti-ND-O-LID (6%).

Em nosso estudo, a análise isolada dos testes aplicados revelou uma sensibilidade para anti-LID-1 (63,2%), anti-ND-O-LID (57,9%), qPCR RD (36,8%) e baciloscopia (30,2%). Entretanto, o emprego da *Random Forest* possibilitou aumento expressivo na sensibilidade no diagnóstico de MB (90,5%) e especialmente de PB (70,6%). É importante destacar que a especificidade na *Random Forest* foi de 92,5%.

Desta forma, nossa metodologia de análise integrada vem contribuir de forma significativa para o diagnóstico da hanseníase principalmente na forma PB, onde a produção de anticorpos e a carga bacilar são caracteristicamente reduzidas.

Avançando em nossa análise, considerando a excelente performance da *Random Forest* para o diagnóstico de casos, exploramos o emprego desta análise para o monitoramento de contatos em um período de 5 anos. Verificamos um alto índice de contatos com predição de “doente” no ano de 2011. Embora estes indivíduos não apresentassem sintomas clínicos suficientes para concluir o diagnóstico de hanseníase, nossos dados sinalizaram que deveriam ser submetidos a uma avaliação clínica periódica, uma vez que a predição “doente” sugere infecção subclínica indicando que o indivíduo está muito próximo do adoecimento. Essa informação foi reforçada em 2012 com o diagnóstico clínico de 03 casos novos dentre os contatos.

Durante o monitoramento dos contatos no período de 05 anos, constatou-se uma importante redução na frequência de predição “doente”, conforme esperado (FIGURA 13). Este fato pode estar relacionado com diminuição da exposição ao bacilo após tratamento do caso, bem como com a ativação do sistema imune pela administração de BCG (LYON; GROSSI, 2013). Em 2016, apenas um indivíduo continuou com a predição “doente” que vem se repetindo desde 2011. Atualmente a avaliação clínica desse indivíduo indicou suspeita de hanseníase e biópsia de lesão de pele foi solicitada.

Surpreendentemente, observamos também grande mudança na frequência de predição “doente” para “sadio”. E de forma notável, verificamos que na maioria dos contatos a força de predição “sadio” em 2016 era alta, superior ao valor -0,5 (FIGURA 13), reforçando a correta classificação e indicando evolução para cura da infecção subclínica.

Desta forma, o modelo proposto pela análise *Random Forest* permitiu diagnosticar casos de hanseníase com alta sensibilidade e especificidade, bem como identificar precocemente novos casos entre os contatos domiciliares durante o monitoramento. Além disso, nosso estudo possibilita o direcionamento de quimioprofilaxia exclusivamente para aqueles contados com infecção subclínica, contribuindo para o controle efetivo da hanseníase.

6 CONCLUSÃO

Análises dos testes sorológicos e moleculares de forma não integrada demonstram baixa sensibilidade o que limitaria seu uso para o diagnóstico da hanseníase, permitindo apenas uma triagem na população ou categorização de casos clinicamente diagnosticados.

No entanto, a aplicação da *Random Forest* para análise integrada dos testes sorológicos e moleculares promoveu maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico de casos de hanseníase MB e especialmente PB.

Em relação aos contatos domiciliares, a análise conjunta dos dados pela *Random Forest* configura um importante indicador de evolução da infecção subclínica para cura ou adoecimento, mesmo na ausência de lesão de pele ou danos de nervos.

7 PERSPECTIVAS

Uma avaliação mais abrangente do uso integrado de testes sorológicos e moleculares no diagnóstico precoce da hanseníase por meio da *Random Forest* torna-se necessária, pois poderia auxiliar de forma mais precisa a interrupção da cadeia de transmissão do *M. leprae*. Portanto, sugere-se um estudo multicêntrico randomizado para validação do modelo e criação de um aplicativo para smartphone, que poderá proceder a análise e definir uma predição (Sadio ou Doente) para o indivíduo avaliado e indicação de tratamento ou quimioprofilaxia.

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAFEZ, H. Z.; MOHAMED, E. E.; ABD-ELGHANY, A. A. Tissue and blood superoxide dismutase activity and malondialdehyde level in leprosy. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 24, n. 6, p. 704-8, jun. 2010.

AMORIM, F. M. *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: Sep. 2016.

ARÁOZ, R. *et al.* Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 175–182, 2006.

ARAÚJO S. *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**, Dec. 2012.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. **Dermatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

BAFICA, A., *et al.* TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. **J. Exp. Med.**, v. 202, n. 12, p. 1715-1724. 2005.

BAKER, P. T. Multivariate Classification with Random Forests for gravitational wave searches of black hole binary coalescence. **Phys. Rev.**, v. 91, n. 6, 2014.

BAKKER, M. I. *et al.* Population survey to determine risk factors for *M. leprae* transmission and infection. **Int. J. epidemiol.**, Oxford, v. 33, p.1329-1336, dez. 2004.

BARRETO, J. G. *et al.* Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. **Leprosy Review**, London, v. 82, p. 358-370, dez. 2011.

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

BELL-KROTOSKI, J.; TOMANCIK, E. The repeatability of testing with semmes-weinstein monofilaments. **J. Hand. Surg. [Am]**, v. 12, p. 155–161. 1987.

BANERJEE, S. *et al.* Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts - a pilot study from India. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 252, 2010.

BAPTISTA, I. M. F. D.; SARTORI, B. C. S.; TRINO, L. M. Guia de conduta para realização do exame baciloscópico. **Hansen. Int.** v. 31, n. 2, p. 39-41. 2006.

BOCHUD P. Y. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. **J. Infect. Dis.** v. 197, n. 2, p. 253-61. jan. 2008.

BRASIL, M. T. L. R. F. *et al.* Anti PGL-1 serology and the risk of leprosy in a highly endemic area in the State of São Paulo, Brazil: four-year followup. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 6, n. 3, p. 262-71. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseníase.pdf>. Acesso em: 30 set. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o controle da hanseníase.** Brasília: ministério da Saúde, 2002. Disponível em: < http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_controle_hanseníase_cab10.pdf>. Acesso em: 02 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças. **Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional.** Brasília: Ministério da Saúde, 2016. Disponível em: < http://portal.saude.pe.gov.br/sites/portal.saude.pe.gov.br/files/diretrizes_para_eliminação_hanseníase_-_manual_-_3fev16_isbn_nucom_final_2.pdf>. Acesso em: 30 set. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Indicadores epidemiológicos e operacionais de Hanseníase – Brasil: 2001-2016.** 2017. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/10/Indicadores-epidemiológicos-e-operacionais-de-hanseníase-Brasil-2001-2016.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2017.

BREIMAN, L. Random Forests. **Machine Learning**, v. 45, p. 5–32, 2001.

BRETT, S. J. *et al.* Use of synthetic glycoconjugates containing the *M. leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 64, n. 3, p. 476–83, jun. 1986.

BRITO, M. F. *et al.* Association between leprosy reactions after treatment and bacterial load evaluated using anti PGL-I serology and Bacilloscopy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2008.

BUHRER-SEKULA, S. *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.

BÜHRER-SÉKULA, S. *et al.* Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. **Trop. Med. Int. Health.**: TM & IH, v. 6, n.4, p. 317–23, abr. 2001.

BUHRER-SEKULA, S. *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. 1991–1995, 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. *et al.* The additional benefit of the ML flow test to classify leprosy patients. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 172-6, aug. 2009.

BÜHRER-SÉKULA, S. *et al.* The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Leprosy Review**, v. 78, n. 1, p. 70–9, mar. 2007.

CABRAL, P. B. *et al.*; Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *M. leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 17, n. 11, Nov, 2013.

CALEFFI K. R. *et al.*; Use of the polymerase chain reaction to detect *M. leprae* in urine. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 45, n. 2, p. 153-157. 2012.

CARDOSO, C. C. *et al.* Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiol.**, v. 6, p. 533-549. 2011.

CARDOSO, L. P. V. *et al.* Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **Bio. Med. Central Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 497, oct. 2013.

CHATTERJEE, D. *et al.* Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl- alpha-L- hamnopyranosyl)-(1----9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin--the leprosy-specific, natural disaccharide-octylneoglycoprotein. **Carbohydrate Research**, v. 156, p. 39–56, 15 nov. 1986.

CHATURVEDI, V. *et al.* On the value of sequential serology with a *M. leprae* -specific antibody competition ELISA in monitoring leprosy chemotherapy. **Int. j. Lepr. Other Mycobact. Dis.**: official organ of the International Leprosy Association, v. 59, n. 1, p. 32–40, mar. 1991.

CHO, S. N. *et al.* Detection of phenolic glycolipid-I antigen and antibody in sera from new and relapsed lepromatous patients treated with various drug regimens. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**: official organ of the International Leprosy Association, v. 59, n. 1, p. 25–31, mar. 1991.

CHO, S. N. *et al.* Detection of phenolic glycolipid I of *M. leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, n. 1, p. 138–42, jan. 2001.

COLE, S. T. *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, v. 409, n. 6823, p. 1007–11, 22 mar. 2001.

CONTIN, L. A. *et al.* Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 91-95, jan./feb. 2011.

CORRÊA, R. G. C. *et al.* Epidemiological, clinical, and operational aspects of leprosy patients assisted at a referral service in the state of Maranhão, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 45, n. 1, p. 89-94, 2012.

CUNHA, M. D. *et al.* [The impact of leprosy elimination strategy on an endemic municipality in Rio de Janeiro State, Brazil]. **Cad. Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p.1187–97, maio 2007.

DESFORGES, S. *et al.* Specific anti-*M leprae* PGL-I antibodies and Mitsuda reaction in the management of household contacts in New Caledonia. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.:** official organ of the International Leprosy Association, v. 57, n. 4, p. 794–800, dez. 1989.

DÍAZ-URIARTE, R.; ANDRÉS, S. A. Gene selection and classification of microarray data using Random Forest. **BMC Bioinformatics**, 7:3, 2006.

DOUGLAS, J. T. *et al.* Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 11, n. 5, p. 897-900, sep. 2004.

DOUGLAS, J. T. *et al.*, Serological reactivity and early detection of leprosy among contacts of lepromatous patients in Cebu, the Philippines. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 55, n. 4, p. 718-721. 1987.

DUPPRE, N. C. *et al.* Impact of PGL-I Seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: A Cohort Study. **Plos Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 6, n. 6, p. 1711, jun. 2012.

DUTHIE, M. S. *et al.* A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v.79, n.2, p. 233-239, jun. 2014b.

DUTHIE, S. M. *et al.*; Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 15, n. 11, p. 1659–1665. Nov. 2008.

DUTHIE, M. S. *et al.* Rapid quantitative serological test for detection of infection with *M. leprae* the causative agent of leprosy. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 52, n. 2, p. 613-619, feb. 2014a.

DUTHIE, M. S. *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.**, Berlin, v. 30, n. 10, p. 1257–1265, out. 2011.

DUTHIE, M. S. *et al.* Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 14, n. 11, p. 1400-8. Sep. 2007.

FABRI A. C. O. C. *et al.* Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, p. 218, 2015.

FERREIRA, I. N. *et al.* The use of ML Flow test in school children diagnosed with leprosy in the district of Paracatu, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 77-80, 2008.

- FINE, P. E. *et al.* Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on a enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**: official organ of the International Leprosy Association, v. 56, n. 2, p. 243–54, jun. 1988.
- FURINI, R. B. *et al.* Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti PGL-1 antibodies and cosanguinity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 5, p. 536-540, aug. 2011.
- FOSS, N.T. Hanseníase: Aspect clínicos, imunológicos e terapêuticos. **An. Bras. Dermatol.**, n. 74, p. 113-119, 1999.
- FRADE, M. A. C. *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., 2017.
- FUJIWARA, T. *et al.* Chemical synthesis of the trisaccharide unit of the species-specific phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Carbohydr. Res.**, v. 163, n. 1, p. 41–52, 1 jun. 1987.
- GELBER, R. H. *et al.* Serum antibodies to defined carbohydrate antigens during the course of treated leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**: official organ of the International Leprosy Association, v. 57, n. 4, p. 744–51, dez. 1989.
- GELUK, A. *et al.* From genome-based in silico predictions to ex vivo verification of leprosy diagnosis. **Clin. Vaccine Immunol**: CVI, v. 16, n. 3, p. 352–9, mar. 2009.
- GIGG, J. *et al.* The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3- di-O-methyl-alpha- L-rhamnopyranosyl)-(1----2)-3-O-methyl-alpha- L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of. **Chem. Phys. lipids.**, v. 38, n. 3, p. 299–307, set. 1985.
- GOULART, I. M. B.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. **Arch Dermatol Res**, v. 300, n. 6, p. 269-290, 2008.
- GROSSI, M. A. D. F. *et al.* Risk Factors for ML Flow Seropositivity in leprosy patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 39-44, 2008a.
- GROSSI, M. A. D. F.; The influence of ML Flow test in leprosy classification. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 34-38, 2008b.
- HACKER, M. A. *et al.* A profile of patients treated at a national leprosy outpatient referral clinic in Rio de Janeiro, Brazil, 1986–2007. **Rev. Panam. Salud. Publica**, v. 31, p. 485–491, 2012.
- HAND, D.J.; TILL, R.J. A simple generalization of the area under the ROC curve for multiple class classification problems. **Machine Learning**, v. 45, p. 171-186. 2001.

HARBOE, M. Overview of host-parasite relations. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy**. 2. ed. New York: Churchill Livingstone, 1994. Cap. 5, p. 87-112.

HASTINGS, R. C. **Leprosy: medicine in the tropics**. London: Churchill Livingstone, 1986.

HUNGRIA, E. M. *et al.* Seroreactivity to new *M. leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 107, suppl. 1, p. 104-111, dez.2012.

HUNTER, S. W.; BRENNAN, P. J. A novel phenolic glycolipid from *M. leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J. bacteriol.**, v. 147, n. 3, p. 728–35, set. 1981.

INKELES, M. S. *et al.* Comparison of molecular signatures from multiple skin diseases identifies mechanisms of immunopathogenesis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 135, n. 1, p. 151-159, jan. 2015.

IZMIRLIAN, G. Application of the Random Forest Classification Algorithm to a SELDI-TOF Proteomics Study in the Setting of a Cancer Prevention Trial. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1020, p. 154-174, 2004.

JARDIM, M. R. *et al.* Role of PGL-I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. **Lepr. Rev.**, v. 76, n. 3, p. 232–40, set. 2005.

JOB, C. K. *et al.* Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 518–21. 2008.

KANG, T. J. *et al.* Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in diagnosis of *Mycobacterim Leprae*. **Exp. Dermatol.**, v. 28, p. 420-424, jul. 2003.

KAMPIRAPAP, K. *et al.* DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. **Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis.**, v. 66, p. 16–21, mar.1998.

KLATSER, P. R. *et al.* Evaluation of *M. leprae* antigens in the monitoring of a dapsone-based chemotherapy of previously untreated lepromatous patients in Cebu, Philippines. **Lepr. Rev.**, v. 60, n. 3, p. 178–86, set. 1989.

KRUTZIK, S. R, *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. **Nat. Med.** v. 11, n. 6, p. 653-60. jun 2005.

KRUTZIK, S. R. *et al.* IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 181, n. 10, p. 7115–20, 15 nov. 2008.

LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. de. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 3, p. 389-401, mai. / jun. 2014.

LIAW A.; WIENER, M. Classification and regression by random. **Forest**, Vol. 2/3, Dec. 2002.

LIMEIRA, O. M. *et al.* Active search for leprosy cases in midwestern brazil: A serological evaluation of asymptomatic household contacts Before and after prophylaxis with bacillus calmette-guérin. **Rev. Inst. Med. Trop.**, Sao Paulo, v. 55, n. 3, 2013.

LOBATO, J. *et al.* Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Leprosy Review**, London, v. 82, n. 4, p. 389-401, dez. 2011.

LYON, S. *et al.* Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 41, suppl.II, p. 23-26, 2008.

LYON, S. *et al.* **Dermatologia Tropical**. Rio de Janeiro. Medbook. 2016.

LYON, S.; GROSSI, M. A. F. **Hanseníase**. Rio de Janeiro. Medbook. 2013.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 10, p.1354. 2011.

MARTINEZ, N.A. *et al.*; Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *M. leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 3154-3159. 2006.

MARTINEZ, A. N. *et al.* Molecular detection of *M. leprae* viability by use of Real-Time PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 7, p. 2124-2130, jul. 2009.

MARTINEZ, A. N. *et al.* PCR-Based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the Clinic. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 8, n. 4, p. 2655. 2014.

MEDRONHO, R. A. (Org.). **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu. 2000.

MEDRONHO, R. A. Estudos ecológicos. In: MEDRONHO, R.A. (Org.) *et al.* **Epidemiologia**. São Paulo: Atheneu; 2006. p. 191-198.

MENZEL, S. *et al.* Antibodies to a synthetic analog of phenolic glycolipid-I of *M. leprae* in healthy household contacts of patients with leprosy. **Int. j. Lepr. Other Mycobact. Dis.**: official organ of the International Leprosy Association, v. 55, n. 4, p. 617–25, dez. 1987.

MIRA, M. T. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. **Microbres Infect. / Institut Pasteur**, v. 8, n. 4, p. 1124–31, abr. 2006.

MONARD, M.C.; BARANAUSKAS, J.A. Conceitos de aprendizado de máquina. In: REZENDE, S.O. **Sistemas Inteligentes: fundamentos e aplicações**. Barueri, SP: Manole, 2003. Cap. 4, p. 89-114.

MONOT, M. *et al.* Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium Leprae*. **Nat. Genet.**, v. 41, n. 12, p. 1282-1290, dez. 2009.

MORAIS, P. B. *et al.*; Perfil epidemiológico da hanseníase num município superendêmico do interior do sudeste brasileiro. **Hansenol. Int.**, v. 37, n.2, p. 61-68, 2012.

MOURA, R. S. *et al.* Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, suppl. 2, p. 11-18, 2008.

OTTENHOFF, T. Immunology of leprosy: Lessons from and for leprosy. **Int. J. Lepr.**, v. 62, p. 108-121, 1994.

PAYNE, S. N.; DRAPER, P.; REES, R. J. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**: official organ of the International Leprosy Association, v. 50, n. 2, p. 220–1, jul. 1982.

PENNA, M. L. *et al.* The influence of increased access to basic healthcare on the trends in Hansen's disease detection rate in Brazil from 1980 to 2006. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 2008.

PLIKAYTIS, B. B.; GELBER, R. H.; SHINNICK, T. M. Rapid and sensitive detection of *M. leprae* using a nested-primer gene amplification assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 8, n. 9, p. 1913–1917. 1990.

QIONG-HUA, P. *et al.* Early revelation of leprosy in China by sequential antibody analyses with LID-1 and PGL-1. **J. Trop. Med.**, Cairo, 2013.

RADA, E. *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.**, Rio de Janeiro, v. 107, suppl. 1, p. 90-94, dez. 2012.

RAVVUKKANA, A. *et al.* Neural targeting of *M. leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. **Cell**, v. 88, p. 811–21. 1997.

REIS, E. M, *et al.* *M. leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and highrisk for leprosy onset. **Clin. Microbiol. Infect.**, 2013.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity: a Five group system. **Int. J. Lepr.**, v. 34, p. 255-273, jul. / sept. 1966.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy for research purposes. **Lepr. Rev.**, v. 33, p. 119-128. 1962.

ROCHE, P. W. *et al.* Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**: oficial organ of the International Leprosy Association, v. 61, n. 1, p. 35–43, mar. 1993.

ROCHE, P. W.; THEUVENET, W. J.; BRITTON, W. J. Risk factors for type-1 reactions in borderline leprosy patients. **Lancet**, v. 338, n. 8768, p. 654–7, 14 out. 1991.

SAAD, M. H. *et al.* IgM immunoglobulins reacting with the phenolic glycolipid-1 antigen from *M. leprae* in sera of leprosy patients and their contacts. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 85, n. 2, p. 191–4, 1990.

SAINI, C.; RAMESH, V.; NATH, I. CD4⁺ Th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non Th1, Non Th2 T cells in human leprosy. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v. 9, n. 7, 2013.

SALGADO, C. G.; BARRETO, J. G. Leprosy transmission: still a challenge. **Acta. Derm. Venereol.** v. 92, n. 3, p. 335, 2012.

SAMPAIO, L. H. *et al.* Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC. Infect. Dis.**, v. 11, p. 26–, 2011.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI. **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1998.

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

SCHWENDER, H. *et al.* A pilot study on the application of statistical classification procedures to molecular epidemiological data. **Toxicol. Lett.**, v. 151, n. 1, p. 291-9, jun. 2004.

SCOLLARD, D. M. *et al.* The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 19, n. 2, p. 338-81, maio 2006.

SCOLLARD, D. M.; GILLIS, T. P.; WILLIAMS, D. L. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *M. leprae* in patients in the United States. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 109, n. 5, p. 642–646, maio. 1998.

SELING, P. A., MODLIN, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. **Immunobiology.** v. 191, n. 4-5, p. 378-387. 1994.

SILVA, R. C. *et al.* Correlation between ELISA and ML Flow assays applied to 60 Brazilian patients affected by leprosy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 104, n. 8, p. 546–550, aug. 2010.

SOUSA, A. L. *et al.* *M. leprae* DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 5, p. 829-833, 2007.

SOUZA, M. M. *et al.* Utility of recombinant proteins LID-1 and PADL in screening for *M. leprae* infection and leprosy. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 108, n. 8, p. 495-501, aug. 2014.

SPENCER, J. S. *et al.* Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 107, suppl. 1, dez. 2012.

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

STEFANI, M. M. *et al.* Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.:** official organ of the International Leprosy Association, v. 66, n. 3, p. 356–64, out. 1998.

STEFANI, M. M. A. Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41(Suplemento II), p. 89-94, 2008.

STEFANI, M. M. A. *et al.* Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 107, suppl. I, p. 124-131, dez, 2012.

TABOURET, G, *et al.* *M. leprae* phenolglycolipid-1 expressed by engineered *M. bovis* BCG modulates early interaction with human phagocytes. **PLoS. Pathog.**, v. 6, n. 10, 2010.

TALHARI, S.; NEVES, R.G.; OLIVEIRA, S.G. Manifestações cutâneas e diagnóstico diferencial. In: **Hanseníase**, 2. ed. Manaus: Instituto Superior de Estudos da Amazônia. Manaus. 1989; p. 37-58.

TEAM, R. C. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna: Austria, 2015.

TEIXEIRA, A. C. *et al.* Evaluation of the agrément between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, suppl. II, p. 48-55, 2008.

TELES, R. M. B. *et al.* Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. **Science**, New York, v. 339, n. 6126, p. 1448–53,22, mar. 2013.

Truman, R.W. *et al.* Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2, n. 11, 2008.

TURANKAR, R. P. *et al.* Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of *M. leprae* DNA from clinical and environmental samples. **Int. J. Mycobacteriol**. v. 4, n. 1 p. 54-9. 2015.

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

WEISS, S. M.; KULIKOWSKI, C. A. Computer systems that learn: classification and prediction methods from statistics, neural nets, machine learning, and expert systems. **Morgan Kaufmann Publishers Inc.**, San Francisco, CA, USA, 1991.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO: Geneva, 1982 (Technical Report Series, n. 675).

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, v. 91, n. 35, p. 405–420, 2016.

- WOODS, S. A.; COLE, S. T. A rapid method for detection of potentially viable *M. leprae* in human biopsies: a novel amplification of PCR. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 65, p. 305-309. 1989.
- WONG, S. H. *et al.* Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. **PLoS. Pathog.** 2010.
- WOROBEC, S. M. Current approaches and future directions in the treatment of leprosy. **Res. Rep. Trop. Med.**, v. 3, p. 79-91, 2012.
- ZENHA, E. M. R.; FERREIRA, M. A. N.; FOSS, N. T. Use of anti-PGL-1 antibodies to monitor therapy regimes in leprosy patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 10, p. 968-972, out. 2009.

APÊNDICE A – ARTIGO

ANEXO A – PARECER DO COMITE DE ÉTICA E PESQUISA - CEP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVALE

COMITE DE ETICA EM PESQUISA – CEP

PARECER CEP/UNIVALE 051/2009

“Estudo Integrado da hanseníase no Município de Governador Valadares: Marcadores Imunológicos de Resistência e susceptibilidade”

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Vale do Rio Doce – CEP/UNIVALE emitiu parecer APROVADO à realização do projeto intitulado “Estudo Integrado da hanseníase no Município de Governador Valadares: Marcadores Imunológicos de Resistência e susceptibilidade”, protocolado sob o nº. PQ 022/09-009. O projeto é coordenado pela Pro^{fa}. Lúcia Alves de Oliveira Fraga.

Orientações ao pesquisador:

Caso haja eventos adversos no decorrer ou decorrentes da pesquisa, o pesquisador responsável deverá notificar imediatamente ao Comitê de Ética, para que possam ser tomadas as devidas providências.

Modificações ou alterações eventuais no projeto deverão ser informadas por escrito ao Comitê de Ética, identificando o que foi alterado acompanhado de justificativa. O Comitê de Ética apreciará o pedido e emitirá o seu parecer.

O pesquisador deverá encaminhar ao Comitê de Ética em Pesquisa da Univale o relatório final (Formulário 10). Outras orientações no site www.univale.br/sites/cep.

Data prevista para entrega do relatório parcial: 15 de abril de 2011.

Data prevista para entrega do relatório final: 13 de abril de 2012.

Este parecer entrará em vigor na data de sua publicação.

Governador Valadares, 25 de Março de 2010.


Pro^{fa} Dr^a Elaine Speziali de Faria
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa


Univale
Universidade Vale do Rio Doce
Governador Valadares - MG

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – Identificação do Responsável pela execução da pesquisa:

<p>Título: <i>Estudo integrado da Hanseníase no Município de Governador Valadares</i> <i>.Marcadores Imunológicos de resistência e susceptibilidade.</i> MS/SCTIE/DECIT 2008 - UNIVVALE – CREDEN – PES/SMS.</p>
<p>Pesquisador Responsável: Prof^a. Dr^a. Lúcia Alves de Oliveira Fraga</p>
<p>Coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Imunologia : Prof^a. Dr^a. Lúcia Alves de Oliveira Fraga</p>
<p>UNIVVALE - Laboratório de Pesquisa em Imunologia Rua Israel Pinheiro, 2000 – Campus Universitário/Bloco F13 Telefones: (33) 3279 5982 / 3279 5983</p>
<p>Comitê de Ética em Pesquisa Rua Israel Pinheiro, 2000 – Campus Universitário – Tel.: 3279 5575</p>

Informações ao participante ou responsável:

1. Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa intitulada “*Estudo integrado da Hanseníase no Município de Governador Valadares. Marcadores Imunológicos de resistência e susceptibilidade.*” MS/SCTIE/DECIT 2008 - UNIVVALE – CREDEN – PES/SMS.
2. Essa pesquisa tem como objetivo, entender porque algumas pessoas tendo contato com os doentes podem desenvolver a doença e outras não.
3. A doença hanseníase é causada pelo micróbio chamado *M. leprae*. Essa doença pode causar o aparecimento de manchas na pele, caroços e perda da sensibilidade a dor.
4. Durante o exame clínico, o médico fará perguntas a respeito da doença hanseníase que alguém da sua família tem e que mora na mesma casa que você. Você poderá recusar a responder qualquer pergunta que por ventura lhe causar algum constrangimento.
5. Além do exame médico, é necessário realizar testes para auxiliar o médico a detectar a doença. Um destes testes é chamado de Teste de Fluxo lateral. Este é um teste utilizado na rotina médica e consiste na coleta de sangue do seu braço. O sangue também será utilizado para a realização de outros testes como, por exemplo, o teste de ELISA para medir anticorpos e outras substâncias presentes no sangue como as citocinas que irão mostrar como o seu organismo se defende deste micróbio. Estes testes serão realizados no laboratório de Imunologia da Univale e para isso será necessário coletar cerca de 30 ml do seu sangue.
6. O sangue será coletado por profissional treinado. Todo o material utilizado para a coleta é estéril e descartável e será utilizado uma única vez, portanto, não há risco de contaminação. A coleta de sangue pode causar leve dor local, podendo em alguns casos levar a formação de pequenos hematomas locais e discreto sangramento.

7. Caso os resultados dos exames clínicos e laboratoriais sejam positivos para a hanseníase, você será orientado adequadamente e encaminhado para tratamento médico gratuito.
 8. Você não é obrigado a fazer os exames e nem doar o seu sangue. A recusa não lhe causará nenhum prejuízo.
 9. A sua participação ou da pessoa sob sua responsabilidade neste trabalho, não envolve risco de você ficar doente ou de pegar alguma doença ao doar o seu sangue, pois o material de coleta é estéril e descartável.
 10. A sua participação ou da pessoa pelo qual você é responsável, como voluntário, não lhe conferirá nenhum privilégio, ou seja, a pessoa não receberá nenhum dinheiro pela participação. Entretanto lhe serão garantidos todos os cuidados necessários pela sua participação de acordo com seus direitos individuais e respeito ao seu bem estar físico e psicológico.
 11. Este estudo vem contribuir para a identificação de fatores relacionados à expansão da Hanseníase e com isso a elaboração de medidas para o controle da doença no município.
 12. Serão garantidos o silêncio e privacidade das informações, sendo reservado a Você ou ao seu responsável o direito de não se identificar.
 13. Na apresentação dos resultados seu nome não será citado, nem daquele pelo qual você é responsável.

 14. A sua participação é importante, pois auxiliará no diagnóstico precoce da hanseníase, bem como no tratamento. Desta forma pode se evitar o desenvolvimento da doença para uma forma mais grave.
- Se você concordar em participar do estudo assine seu nome abaixo. Se você for menor de idade (18 anos), o seu responsável deverá assinar o termo de consentimento por ele (a).

Governador Valadares, _____ de _____ de 2011.

Nome do Participante:

Responsável (se necessário):

Pesquisador(a): Dra Lúcia Alves de Oliveira Fraga:
