

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MARCELO DOS SANTOS BARBOSA

**PRODUÇÃO DE POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE PARA
UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HANSENÍASE**

Dourados, 2019

MARCELO DOS SANTOS BARBOSA

**PRODUÇÃO DE POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE PARA
UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HANSENÍASE**

Área CNPq: 40101096

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Silvana Beutinger Marchioro

Dourados, 2019

MARCELO DOS SANTOS BARBOSA

**PRODUÇÃO DE POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE PARA
UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HANSENÍASE**

Orientadora: Prof.^a Dra. Silvana Beutinger Marchioro

Banca examinadora:

Titular: Dra. Sara Santos Bernardes

Titular: Dr. Sebastião Martins de Souza Neto

Titular: Dra. Simone Simionatto

Suplente: Dra. Elaine Costa Souza

Dourados, 2019

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, especialmente à minha mãe,
Maria Aparecida, por ser o sinônimo de tudo de bom que aprendi e
que recebi até hoje.*

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, pela capacidade, e pela oportunidade de desenvolver este projeto.

Aos meus pais, Sebastião Messias e Maria Aparecida, por terem sido tão perfeitos como pais, por terem feito o impossível para me proporcionar o melhor.

À minha orientadora, Silvana Beutinger Marchioro, por sua inteligência e ser incansável na arte de educar, mostrando em todos os momentos humanidade e profundos conhecimentos para me orientar, capacitando-me para ser pesquisador e construir conhecimento.

À Dra. Simone Simionatto, por ser tão receptiva e prestativa para comigo em todos os momentos em que seu auxílio foi requisitado, por me adotar como filho em seu grupo de pesquisa e pela sinceridade em todos os momentos que foram necessários.

À magíster Joyce Alencar que me provocou para ingressa no mestrado, seu exemplo e seu empenho nas searas do doutorado, inspirou-me a enveredar pelos caminhos da pesquisa e produção de saberes.

Às minhas tão queridas amigas, Ana Claudia Piccinelli e Priscila Morato, por estarem sempre ao meu lado em momentos de muita alegria e principalmente em momentos de algúria nos quais me fortaleceram e guarneceram para que seguisse a diante.

Ao Dr. Pablo Christiano B. Lollo, pela amizade, auxílio e conselhos valiosos em muitos momentos.

Aos amigos que conquistei durante este período e que se tornaram parte incontestável do meu crescimento, o meu muito obrigado por terem me proporcionado muitos momentos de descontração e alegria, à Kesia Silva, Laís Ortolani, Claudio Gomes, Flora Martinez, Renato Moreira, Carol Cavarson e Luana Carbonera.

Aos demais amigos que fiz durante este período, Júlio Queiroz, Elaine Souza, Valfredo Junior, Pamela Andreotti, Peceu Magyve, Isabela Cruz, Ronaldo Omizolo e Romário Oliveira.

Às técnicas de laboratório, Camila, Débora, Giseli, Mariana, Kamila e Lujan.

Às alunas de iniciação científica Maria Lorenza, Jaqueline Menezes e Pamela Saccomani por em auxiliarem durante os experimentos.

À Dra. Sibeles Borsuk da Universidade Federal de Pelotas por ter me recebido e auxiliado em parte essencial desta pesquisa.

Aos colegas e amigos da Universidade Federal de Pelotas, André Grassmann, Mara Andrade, Mara Thais e Silvestre Brilhante pelo grande auxílio prestado, mas principalmente pela hospitalidade e acolhimento afetuoso em que fui recebido.

Ao Dr. Júlio Croda pelas valiosas sugestões que muito acrescentaram neste trabalho.

A Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

Enfim, à todos que de alguma forma contribuíram para elaboração desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“Uma vez eliminado todas as soluções lógicas à um problema, o ilógico, mesmo que improvável, inevitavelmente é a verdade”.

(Sherlock Holmes)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB - Hanseníase Borderline

BCG - Bacillus Calmette-Guérin

BI - Índice bacteriano

BL - Hanseníase Borderline Lepromatosa

BT - Hanseníase Borderline Tuberculoide

C - Citosina

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática

ENH - Eritema nodoso hansênico

G – Guanina

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IgM - Imunoglobulina tipo M

IL-10 - Interleucina tipo 10

IL-12 - Interleucina tipo 12

IL-15 - Interleucina tipo 15

IL-2 - Interleucina tipo 2

INF- γ - Interferon gama

LB – Lúria Bertani

LID1 – Laboratório de Estudos de Doenças Infecciosas, diagnóstico 1

LL - Hanseníase Lepromatosa

MB - Multibacilar

MHC-I - Complexo Maior de Histocompatibilidade tipo I

MHC-II - Complexo Maior de Histocompatibilidade tipo II

MLP-15 – *M. leprae* polipeptídeo - 15

MMP-I - Proteína Principal de Membrana-I

MMP-II - Proteína principal de membrana-II

NDO - 3,6-di-O-metil- β -D-glucopiranosilo (1 \rightarrow 4) 2,3-dio-methylrhamnopyranoside

OMS - Organização Mundial da Saúde

PB - Paucibacilar

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PGL-I - Proteína Glicolípídica

PNL - Hanseníase neural pura

PQT - Poliquimioterapia

RFLP - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

T1Rs - Reação hansênica tipo 1

T2Rs - Reação hansênica tipo 2

Th-I - Linfócito T helper tipo I

Th-II - Linfócito T helper tipo II

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- Alfa

TT - Hanseníase Tuberculoide

ZN - Ziehl Neelsen

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de evolução das taxas epidemiológicas da hanseníase no estado do Mato Grosso do Sul nos anos de 2001, 2004, 2010, 2014 e 2015	12
Figura 2. Gráfico de evolução das taxas epidemiológicas da hanseníase no Brasil nos anos de 2001, 2003 e 2015.	13
Figura 3. Baciloscopia de raspado de pele. A) hanseníase tuberculoide B) hanseníase borderline tuberculoide C) hanseníase borderline borderline D) hanseníase borderline lepromatosa E) hanseníase lepromatosa.....	15

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência de hanseníase registrada em 2014 e o número de novos casos detectados durante 2014 nas regiões de monitoramento da OMS.....	11
Tabela 2. Taxas de sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos disponíveis comercialmente para o diagnóstico da hanseníase em pacientes paucibacilares, multibacilares e hanseníase geral.....	18

RESUMO

PRODUÇÃO DE POLIPEPTÍDEO RECOMBINANTE PARA UTILIZAÇÃO NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA HANSENÍASE

Barbosa, M. S. Dourados/MS: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados; 2015.

A hanseníase também conhecida como lepra ou doença de Hansen é causada pelo bacilo álcool-ácido resistente *Mycobacterium leprae*, é endêmica em várias partes do mundo, afetando milhares de pessoas em diversos países. Existe uma classificação operacional estabelecida pela OMS para fins de tratamento, na qual a doença é dividida em paucibacilar e multibacilar. O tratamento que é baseado na poliquimioterapia de longa duração, é estipulado de acordo com esta classificação. O diagnóstico para hanseníase é baseado na avaliação clínica, tendo em vista que os testes existentes não são confiáveis e normalmente incapazes de detectar os indivíduos do polo paucibacilar da doença. Um método diagnóstico confiável é imprescindível para um melhor controle e diminuição dos índices epidemiológicos da doença. O objetivo deste trabalho foi produzir e purificar um polipeptídeo recombinante de *M. leprae* que demonstre *in silico* capacidade de detecção da hanseníase. O gene codificador de um polipeptídeo sintético (MLP-15) contendo 15 peptídeos de *M. leprae* foi desenhado utilizando o software Vector-NTI e sintetizado pela empresa Epoch Biolab Company®. Análises *in silico* avaliando os parâmetros físico-químicos, estrutura secundária e terciária, além da capacidade de detecção por MHC de classes I e II foram realizadas. O MLP-15 foi clonado e expresso em *E. coli* utilizando a cepa BL21 RP e purificado com coluna de afinidade Ni-NTA em quantidade suficiente para ser utilizado em testes de diagnóstico. Todos os parâmetros avaliados *in silico* indicaram que o MLP-15 possui potencial para ser utilizado em testes sorológicos para a detecção de pacientes com hanseníase.

Palavras-chave: *M. leprae*, polipeptídeo recombinante, diagnóstico, hanseníase.

ABSTRACT

PRODUCTION OF RECOMBINANT POLIPEPTIDE FOR USE IN HOSENIASIS SOROLOGICAL DIAGNOSIS

Barbosa, M. S. Dourados / MS: Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados; 2015.

Leprosy also known as leprosy or Hansen's disease is caused by the alcohol-acid bacillus *Mycobacterium leprae*, is endemic in several parts of the world, affecting thousands of people in several countries. There is an operational classification established by WHO for treatment purposes, in which the disease is divided into paucibacillary and multibacillary. Treatment based on long-term polychemotherapy is stipulated according to this classification. The diagnosis for leprosy is based on clinical evaluation, since existing tests are unreliable and usually unable to detect individuals from the paucibacillary pole of the disease. A reliable diagnostic method is essential for a better control and reduction of the epidemiological indices of the disease. The aim of this work was to produce and purify a recombinant *M. leprae* polypeptide that demonstrates in vitro leprosy detection ability. The gene encoding a synthetic polypeptide (MLP-15) containing 15 peptides from *M. leprae* was designed using Vector-NTI software and synthesized by the company Epoch Biolab Company®. *In silico* analyzes evaluating the physico-chemical parameters, secondary and tertiary structure, besides the capacity of detection by MHC of classes I and II were performed. MLP-15 was cloned and expressed in *E. coli* using BL21 strain RP and purified with Ni-NTA affinity column in sufficient quantity to be used in diagnostic tests. All parameters evaluated *in silico* indicated that MLP-15 has potential to be used in serological tests for the detection of leprosy patients.

Keywords: *M. leprae*, recombinant polypeptide, diagnosis, leprosy.

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. HANSENIASE	3
2.2. AGENTE ETIOLÓGICO	4
2.3. CLASSIFICAÇÃO	5
2.3.1. Classificação de Ridley e Jopling	5
2.3.2. Classificação da hanseníase pela OMS	6
2.4. FORMAS DE APRESENTAÇÃO CLÍNICA E LESÕES	6
2.4.1. Reações Hansênicas	6
2.4.2. Incapacidades e complicações causadas pela Hanseníase	7
2.5. ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS	8
2.6. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENIÁSE	10
2.6.1. Epidemiologia da Hanseníase no Mundo	10
2.6.2. Epidemiologia da Hanseníase no Brasil	11
2.7. DIAGNÓSTICO	13
2.7.1. Avaliação clínica	13
2.7.2. Baciloscopia e Histologia	14
2.7.3. Teste de Mitsuda	15
2.7.4. Reação em Cadeia da Polimerase	16
2.7.5. Testes Sorológicos	16
2.8. PROTEÍNAS DE <i>M. leprae</i> NO DIAGNÓSTICO DE HANSENIÁSE	19
2.8.1. Proteína ML0234 (<i>Lsr2</i>)	20
2.8.2. Proteína ML1358 (<i>TlyA</i>)	20
2.8.3. Proteína ML1214 (p60-family protein)	20
2.8.4. Proteína ML2055	21
2.8.5. Peptídeos de <i>M. leprae</i>	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
5. ARTICLE	29

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase, também conhecida como lepra ou doença de Hansen, é uma doença infecciosa dermatológica e neurológica causadora de lesões do tipo granulomatosa na pele e responsável por lesões incapacitantes com níveis variáveis de 0, I e II (Porto, Figueira et al. 2015). É considerada uma das mais antigas doenças dos seres humanos, conhecida desde os tempos bíblicos, com relatos da sua existência em casos ocorridos a mais de 3000 anos (Eidt 2004). O agente etiológico da hanseníase é o *Mycobacterium leprae* um bacilo álcool-ácido resistente, intracelular não cultivável *in vitro* que apesar de ser encontrado em outros animais silvestres como o tatu e ser cultivável nas patas de roedores, o ser humano é considerado o seu único reservatório natural (Araújo 2003).

A evolução clínica da doença será dependente da resposta imune do hospedeiro, sendo que, havendo uma resposta apropriada de células T, ou seja, resposta citotóxica mediada por Th-1, neste caso a doença se manifestará de forma mais branda com poucos bacilos sendo paucibacilar (PB) e situando-se no polo tuberculóide. No entanto, quando o hospedeiro apresentar uma predominância de células Th-2 com posterior resposta humoral, que é ineficiente no combate de patógenos intracelulares como o *M. leprae* o desfecho será a doença de forma mais agressiva com presença de bacilos em maior quantidade, sendo multibacilar (MB) situada no polo Lepromatoso (Jurado, Rodriguez et al. 2015).

Estudos genéticos mostram que a hanseníase se originou na África, próximo ao oriente médio, e se espalhou pelo mundo através das migrações humanas. A doença chegou no Brasil no século XVI, durante o processo de colonização, primeiramente no Rio de Janeiro, Salvador e Recife e em poucos anos se disseminou para os demais estados chegando a São Paulo e Minas Gerais (Cunha, Pedrosa et al. 2015).

Muitos países, além do Brasil, não atingiram a meta de diminuição da carga de hanseníase estipulada pela Organização mundial da saúde (OMS), outros atingiram a meta mas ainda são endêmicos, e novos casos continuam aparecendo todos os anos. Considerando que o problema na eliminação da hanseníase está no grande número de novos casos e na dificuldade na detecção de casos subclínicos, temos como entrave para o cumprimento desta meta de eliminação em muitos países a inexistência de um método diagnóstico confiável que detecte além dos casos multibacilares os casos subclínicos e paucibacilares (Nsagha, Bamgboye et al. 2011, Kumar, Parkash et al. 2014).

O diagnóstico da hanseníase é baseado principalmente nas apresentações clínicas, onde são avaliadas as lesões e comprometimento neurológico. As ferramentas existentes são apenas

suficientes para o auxílio e classificação da doença. Apesar de existir testes sorológicos baseados em antígenos do *M. leprae*, estes ainda não são suficientes para detectar todos os casos positivos da doença (Kim, Prithiviraj et al. 2013). A proteína glicolípídica-I (PGL-I) testada em soros de pacientes positivos através de ELISA foi capaz de detectar altos títulos de IgM em pacientes lepromatosos, porém os níveis encontrados em pacientes tuberculóides foi bastante inferior, demonstrando baixa sensibilidade para este último grupo (Brett, Draper et al. 1983).

Além do sequenciamento de espécies de Micobactérias o desenvolvimento de estudos relacionados ao DNA também vem permitindo que se realize a clonagem de genes e produção de proteínas recombinantes, isso trouxe um impacto para a compreensão dos mecanismos biológicos de diversos patógenos (Bashiri and Baker 2015). As proteínas recombinantes são potenciais ferramentas que podem ser utilizadas na produção testes diagnósticos e vacinas, no caso da hanseníase elas poderão ajudar no diagnóstico dos pacientes do polo tuberculóide com um teste capaz de atender as necessidades de especificidade e sensibilidade requerida para tal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.HANSENIASE

A hanseníase é uma doença relacionada a condições econômicas afetando com maior frequência pessoas de classes sociais mais baixas e com menor nível de escolaridade, sendo considerada uma doença negligenciada. Outras questões como o estigma sofrido pelos pacientes, bem como as incapacidades permanentes deixadas pela doença também são características que são levadas em consideração quando se pensa na situação de endemia de hanseníase (Nsagha, Bamgboye et al. 2011, Parise-Fortes, Lastória et al. 2014).

Na década de 1980 existiam cerca de 10 milhões de pessoas com a doença no mundo (WHO 1998). Em 1991 a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu uma meta para a redução do número de casos de hanseníase (redução da carga de hanseníase) e eliminar a doença como problema de saúde pública no mundo bem como a diminuição do número de casos com incapacitação, a meta de prevalência estipulada pela OMS é de um caso para cada 10.000 habitantes e para tal foram padronizadas a utilização da poliquimioterapia e a utilização indiscriminada da vacina (BCG) (Rodrigues and Lockwood 2011), graças a isso o número de doentes caiu para 250 mil casos em 2012 (WHO 2015). Apesar da diminuição gradativa do número de casos, o Brasil continua com a prevalência acima de 1 caso/10.000 habitantes, sendo que esse coeficiente ficou em 1,27 em 2014 (Brasil, 2014). Entre os países que ainda são endêmicos o Brasil se encontra em segundo lugar em número de novos casos, ficando atrás apenas para a Índia (WHO 2015).

Existem estudos indicando que a hanseníase possa ter se originado na África, (Cunha, Pedrosa et al. 2015) porém ainda existe pouca certeza sobre sua origem, isso se deve aos poucos registros confiáveis que possam indicar a origem da doença. Entre os principais registros que indicam sua origem, temos a descrição de que esteve presente na Índia e no Egito no século 7 A.C (da Cunha 2002), há relatos da presença da hanseníase na Índia 600 A.C em um tratado indiano e também indícios da doença em crânios datados de 200 A.C e na China 300 A.C existe uma descrição clínica completa da hanseníase (Robbins, Tripathy et al. 2009).

A bíblia hebraico-cristã também descreve a doença com orientações sobre sua identificação e cuidados, porém não é possível dizer com certeza que a doença descrita tratava-se realmente da hanseníase devido a gama de doenças com apresentações clínicas semelhantes que também eram endêmicas na época (da Cunha 2002; Monot, Honore et al. 2005).

Na idade média a hanseníase tornou-se endêmica na Europa como consequência do aumento populacional, da concentração de pessoas em pequenas cidades medievais, da

constante chegada e saída de pessoas das Cruzadas e migração de pessoas para esta região. Além disso, a doença possuía maior virulência e os médicos da época não conseguiam diferenciar a hanseníase de outras doenças dermatológicas da época (da Cunha 2002).

2.2. AGENTE ETIOLÓGICO

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente da classe *Schizomycetes*, ordem *Actinomycetales* família *Mycobacteriaceae*, o qual foi identificado pela primeira vez em 1873 por Gerhard Armauer Hansen (Lastória and Abreu 2014). O *M. leprae* tem o formato de uma haste brevemente curva medindo 1,5-8 microns de comprimento por 0,2-0,5 microns de diâmetro. O *M. leprae* é invisível quando corado com gram, aparecendo apenas manchas ou bacilos gram-positivo. Para a coloração do *M. leprae* é utilizada o ácido fucsina, no método Ziehl-Neelsen (ZN) (Goulart, Penna et al. 2002, Lastória and Abreu 2014).

A temperatura ideal de crescimento do *M. leprae* varia de 27-30 °C e por isso acomete principalmente as áreas mais frias do corpo, como pele, testículos, nervos periféricos e vias respiratórias superiores atingindo principalmente macrófagos e células de Schwann. (Lastória and Abreu 2014). O bacilo da hanseníase não pode ser cultivado *in vitro*, porém cresce na pata de ratos (Shepard 1960). Aparentemente o *M. leprae* parece ser dependente de metabolitos do seu hospedeiro, isso explica o porquê de ele não ter sido cultivado *in vitro* até hoje (Cole, Eiglmeier et al. 2001).

Em 1971 o bacilo foi inoculado em tatus por Kirchheimer e Stors (Kirchheimer and Storrs 1971), o que permitiu obter antígenos do bacilo em quantidade suficiente para iniciarem-se estudos de caracterização de seus antígenos. Desde então já foram identificadas diversas proteínas específicas do *M. leprae*, entre elas o PGL-I (Engers, Bloom et al. 1985).

O sequenciamento genético do *M. leprae* também foi um avanço trazendo informações adicionais para futuros estudos e permitindo que se isolasse genes e produzisse proteínas para estudos diversos sobre a doença. O bacilo da hanseníase possui um total de 3.268.203 pares de base (pb) com 57,8% de G+C, do total dos genes cerca 49% (1604) são codificadores de proteínas, restando 27% de pseudogenes e os demais 25% não são codificáveis (Cole, Eiglmeier et al. 2001).

Dos genes codificadores de proteínas encontrados no *M. leprae*, 1.439 estão também presentes no *Mycobacterium tuberculosis* e a análise proteômica comparativa entre os bacilos causadores da tuberculose e o da hanseníase demonstrou a presença de 391 proteínas solúveis no *M. leprae* e 1.800 no *M. tuberculosis*, isso demonstra que em um processo evolutivo onde

os dois possuem um ancestral em comum o bacilo da hanseníase perdeu aproximadamente 80% de seus genes (Cole, Brosch et al. 1998, Cole, Eiglmeier et al. 2001).

Em 2008 foi identificada, no México, uma nova espécie causadora de hanseníase difusa com um comprometimento do fígado e diversos outros sinais sistêmicos como taquicardia, insuficiência respiratória e cianose, a descrição inicial foi em dois pacientes que vieram à óbito de hanseníase. O bacilo foi sequenciado e uma diferença no RNA ribossomal e em mais 5 genes em comparação com o *M. leprae*, o novo bacilo foi denominado *M. lepromatosis* e o estudo genético dessa espécie indica que ela teve um ancestral comum com outras Micobactérias e que ela pode ser responsável pela variabilidade geográfica e de apresentações clínicas da doença (Han, Seo et al. 2008).

2.3.CLASSIFICAÇÃO

A classificação da hanseníase nas formas indeterminada, dimorfa, tuberculoide e virchowiana foram proposta pela primeira no Congresso Internacional de Hansenologia de Madri em 1953 (Ridley and Jopling 1966). Após foram criadas as outras formas de classificação da doença, a classificação de Ridley e Jopling em 1966 e a classificação da OMS 1982 e 1988 (Ridley and Jopling 1966, Goulart and Goulart 2008).

2.3.1. Classificação de Ridley e Jopling

Em 1966 *Ridley e Jopling* criaram um aspecto clínico-imunológico da doença com base na histologia das lesões, classificando-a em seis diferentes apresentações sendo elas: hanseníase tuberculoide (TT), hanseníase lepromatosa (LL), limítrofe-tuberculosa (BT), limítrofe-borderline (BB), limítrofe-lepromatosa (BL), além de uma forma onde não era capaz fazer uma classificação precisa, determinada hanseníase indeterminada (I) (Ridley and Jopling 1966).

Na forma TT, o indivíduo apresenta um menor número de lesões e uma pequena ou nenhuma quantidade de bacilos nos raspados pertencendo assim ao polo paucibacilar (PB). Já na forma LL o indivíduo apresentará grande número de lesões e de bacilos nos raspados, se enquadrando no polo multibacilar (MB) (Mattos, Oliveira et al. 2014). As demais formas são denominadas como intermediárias, pois a resposta imunológica ao bacilo não é definida e variável, outra forma da doença é denominada indeterminada e é assim definida por não ter uma classificação possível (Trindade, Benard et al. 2010).

Os pacientes limítrofes possuem certa resistência ao bacilo causando uma resposta imunológica com alterações na morfologia em que o granuloma se torna menos compacto e mais edematoso, isso ocorre pelo fato dos bacilos se multiplicarem induzindo essa resposta com

número diminuído de células epitelióides. Os pacientes limítrofes que interrompem o tratamento ou que possuem resistência ao antibiótico pode fazer um movimento passando para a forma Virchowiana, posteriormente os indivíduos com a forma Virchowiana que vieram das formas limítrofes foram classificados por Ridley como hanseníase Virchowiana subpolar (LLsp) (Trindade, Benard et al. 2010).

2.3.2. Classificação da hanseníase pela OMS

Em 1982 a OMS criou uma classificação exclusivamente através da baciloscopia que é determinada por um índice bacteriano (BI), dessa forma através da contagem de todos os bacilos em um esfregaço é feita a expressão em um logaritmo sendo: 1+ (pelo menos um bacilo em 100 campos contados), 2+ (1 bacilo em 10 campos), 3+ (um bacilo em todos os campos), 4+ (10 bacilos em todos os campos), 5+ (100 bacilos em cada campo) e 6+ (1000 bacilos em todos os campos) (Talhari, Talhari et al. 2015).

Outra classificação foi criada pela OMS em 1988, neste caso para nortear o uso da poliquimioterapia, a classificação foi realizada dividindo a doença em dois polos de acordo com a carga bacilar e número de lesões, resultando então na classificação no polo paucibacilar, onde o indivíduo apresenta poucas lesões e baciloscopia normalmente negativa, o outro polo é multibacilar, onde o indivíduo apresenta mais de cinco lesões de pele e baciloscopia positiva, sendo que independentemente do número de lesões, quando a baciloscopia é positiva o paciente é considerado multibacilar (Goulart and Goulart 2008),

No Brasil uma classificação operacional divide a hanseníase nos dois tipos polares, hanseníase lepromatosa com apresentação de mais de 5 lesões e baciloscopia positiva e tuberculóide em indivíduos que apresentam menos que 5 lesões e baciloscopia negativa, essa definição foi estabelecida pelo ministério da saúde para fins de tratamento em áreas onde o serviço de saúde não permite a realização de exames mais elaborados como histologia (Araújo, 2003).

2.4.FORMAS DE APRESENTAÇÃO CLÍNICA E LESÕES

A forma em que a hanseníase irá se apresentar no indivíduo dependerá da interação entre o sistema imunológico do hospedeiro com o bacilo (Ridley and Jopling 1966). As formas mais comuns em que se apresentam as lesões são através de manchas eritematosas ou hipocrômicas, também se observa presença de infiltrações, nódulos tubérculos ou placas (Jopling 1971).

2.4.1. Reações Hansênicas

Reação hansênica é assim denominado por tratar-se de uma reação exacerbada do sistema imunológico contra o *M. leprae*, essa reação pode ocorrer dentro do curso crônico da doença, normalmente em indivíduos multibacilares podendo ser durante, antes ou após o tratamento, muitas vezes o diagnóstico da hanseníase acontece quando o paciente é hospitalizado devido a um quadro reacional (Kumar, Dogra et al. 2004).

As reações hansênicas acometem cerca de 30% das pessoas com hanseníase (Scollard, Adams et al. 2006). Sendo mais acometidos os pacientes que apresentam as formas limítrofes da hanseníase, ou seja, as formas BT, BB e BL, os quais não possuem estabilidade imunológica à doença, dessa forma têm maior risco de apresentar uma reação à hanseníase (Sharma, Singh et al. 2015).

Os casos reacionais são divididos em reações tipo 1 (T1Rs) e tipo 2 (T2Rs). Os casos T1Rs tem como característica o agravamento das lesões já existentes, mas sem envolvimento sistêmico, isso porque existe uma reação de hipersensibilidade ao *M. leprae* mediada por Th-1 aumentada, gerando uma liberação de citocinas topicamente nas lesões (Cortela, de Souza Junior et al. 2015, Sharma, Singh et al. 2015). Os fatores de risco associados a T1Rs são: pessoas do gênero feminino e múltiplas lesões no momento do diagnóstico. Os pacientes que apresentam a T1Rs normalmente é tratado com corticoides em doses baixas por longos períodos de tempo, quando as reações apresentam melhoras, diminui-se a dosagem do medicamento gradativamente (Walker and Lockwood 2008).

Outro tipo de reação é tipo 2 (T2Rs) ou eritema nodoso hansenico (ENH) ocorre normalmente em pacientes multibacilares caracterizados pela fraca imunidade contra o *M. leprae* (Scollard, Adams et al. 2006) Nos pacientes T2Rs, além de agravamento das lesões de pele, o indivíduo vai apresentar sintomas sistêmicos como febre e mal estar geral, ainda existe uma variante da T2Rs, que é exclusivamente neurológica e sem presença de sinais sistêmicos ou lesões (Cortela, de Souza Junior et al. 2015, Sharma, Singh et al. 2015). Os fatores de risco associados a T2Rs são: pacientes com a classificação LL, gênero feminino e altos índices bacilares (Kumar, Dogra et al. 2004).

2.4.2. Incapacidades e complicações causadas pela Hanseníase

Em 1973 foi determinada por Gonçalves, que incapacidade é toda alteração anatômica ou fisiológica que impeça o indivíduo de realizar uma atividade ou convívio social, seja esse impedimento total ou parcial, permanente ou temporário. No caso da hanseníase, por se tratar de uma doença que acomete nervos, quando não tratada em tempo hábil pode causar incapacidades em diversos graus (Alves, Barreto et al. 2010).

Para se chegar ao grau de incapacidade são avaliados os olhos, dedos, mãos e pés do indivíduo. A finalidade da avaliação motora em pacientes com hanseníase é detectar precocemente as incapacidades. Durante essa avaliação pode se observar alterações como: paralisia facial que pode causar epífora e exposição da córnea, mão em posição de garra, mão caída, pé caído e garras de artelhos (Araújo 2003). As incapacidades são classificadas em graus que vão de 0 a II onde o grau 0 quando não há comprometimento neural nos olhos, pés e mãos; grau I perda de sensibilidade; e o grau II havendo comprometimento neural nas pálpebras, mãos em forma de garra, mãos e pés caídos, entre outros. (Silva Sobrinho, Mathias et al. 2007).

Além de lesões na pele e nervos periféricos a hanseníase também pode ocasionar um envolvimento sistêmico e lesões em outros órgãos como nos rins, onde pode ocasionar glomerulonefrite aguda e crônica, lesões tubulointersticiais, pielonefrite e amiloidose secundária (da Silva, Daher et al. 2015). Uma forma de hanseníase onde o indivíduo não apresenta lesões de pele, mas apenas lesões em nervos, essa forma foi denominada Hanseníase Neural Pura (PNL). Na PNL o indivíduo apresentará sintomas exclusivamente neurais como: sensibilidade ou insensibilidade que pode estar próxima a área de alargamento do nervo, também apresenta parestesia e *déficits* motor sem a presença de lesões de pele (Goulart and Goulart 2008).

2.5.ASPECTOS IMUNOPATOGÊNICOS

Apesar do grande número de estudos e da diminuição dos casos de hanseníase, ainda existem muitas lacunas sobre sua forma de transmissão e os mecanismos de patogenicidade (Rodrigues and Lockwood 2011, Vora and Pilani 2014). Quanto à infecção, existem diversos relatos sobre as formas de eliminação do bacilo, entre elas, a descrição de que a pele como tendo potencial tanto para eliminação quanto como porta de entrada de bacilos (Okada, Komura et al. 1978, Vora and Pilani 2014), porém a principal porta de eliminação e entrada de bacilos é através de aerossóis proveniente das vias respiratórias superiores (Rodrigues and Lockwood 2011). Principalmente proveniente de pacientes com a forma multibacilar (MB) (Araújo 2003), os quais podem eliminar entre 10 mil e 10 milhões de bacilos diariamente através da descarga nasal (Shepard 1960).

A população em sua maioria, cerca de 95%, é naturalmente resistente ao *M. leprae* o que torna a hanseníase uma doença com baixa morbidade apesar de altamente contagiosa (Alves, Barreto et al. 2010, Lastória and Abreu 2014, Lastória and Abreu 2014). Quando o *M. leprae* consegue se infiltrar no organismo adentra as fibras nervosas sensitivas parasitando células de Schwann, posteriormente é captado por macrófagos, através dos quais segue caminho

para áreas periféricas da pele onde se multiplica lentamente (Porto, Figueira et al. 2015), se dividindo uma vez a cada 14 horas (Shepard 1960). De acordo com a resposta imunológica do hospedeiro, a lesão nervosa causada neste caminho percorrido pelo bacilo é o que causa a insensibilidade e lesões de pele características da hanseníase (Porto, Figueira et al. 2015).

A hanseníase tem um período de incubação longo, devido à replicação lenta dos bacilos, o tempo de incubação pode variar entre 2 a 12 anos, sendo de 4 anos em média para a sua forma tuberculoide e 10 anos para a forma Virchowiana (Porto, Figueira et al. 2015), durante este período o indivíduo pode eliminar bacilos mesmo sem apresentar sinais clínicos da doença (Duarte-Cunha, Marcelo da Cunha et al. 2015).

Após se adentrar no organismo e passar um tempo se replicando dentro da célula de Schwann, os bacilos são destruídos por células dendríticas e seus antígenos passam a ser detectados por células T, este processo é mediado pela expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) em células T CD4+ causando uma reação inflamatória com presença de agentes citotóxicos e mediadores de oxidação, que são responsáveis por destruir os bacilos e acabam ocasionando a lise de células Schwann, esse é o processo causador das lesões de pele e inflamação neuronal característicos da hanseníase (van Beers, de Wit et al. 1996, Spierings, de Boer et al. 2001).

Sabe-se que as células dendríticas são maturadas após a captação de um patógeno do qual é extraído antígenos, estes antígenos tornam as células dendríticas imaturas em células apresentadoras de antígenos (Steinman and Hemmi 2006), onde há o envolvimento do MHC-II que também está relacionado com a forma clínica da doença (de Souza-Santana, Marcos et al. 2015). A célula apresentadora de antígenos ativará as células T imaturas tornando-as células efectoras T helper-1 e T helper-2 (Th-1 ou Th-2), que irão produzir anticorpos ou permanecerão como células de memória, esta última poderá ser ativada quando o indivíduo entrar em contato com este patógeno novamente (Steinman and Hemmi 2006).

Os indivíduos paucibacilares apresentam um número limitado de lesões. São lesões benignas e com respostas associadas à Th-1, interferon- γ (INF- γ) e interleucina-2 (IL-2) e interleucina-15 (IL-15), sendo essa uma resposta celular. Já na forma multibacilar existe a predominância de resposta humoral com presença de células Th-2 com interleucina-10 (IL-10) onde os indivíduos apresentam uma forma mais grave da doença com maior número de lesões e bacilos (Blackwell, Jamieson et al. 2009). A liberação de IL-10 em indivíduos multibacilares estimula macrófagos a realizarem a fagocitose de bacilos, porém este mecanismo tem pouca capacidade de eliminação de bacilos já que não possuem boa capacidade antimicrobiana

propiciando o acúmulo de bacilos no interior do próprio macrófago, em contrapartida quando sinalizado por IL-15 o macrófago faz uma fagocitose mais limitada, porém com maior capacidade antimicrobiana evitando o acúmulo de bacilos em seu interior (Montoya, Cruz et al. 2009).

Um estudo demonstrou que o *M. leprae* induz a maturação de células dendríticas de forma variável podendo aumentar a expressão de MHC-II, no mesmo estudo observou-se que pacientes LL apresentaram menores níveis de IL-12 que em pacientes TT. A IL-12 é uma citosina importante na atividade efetora de células Th-1 (Braga, Moretto et al. 2015).

Apesar de se observar a presença de grande quantidade de anticorpos em pacientes MB, isso não evita que normalmente esses indivíduos desenvolvam a forma mais grave da doença, isso por que a defesa mais eficaz contra a doença é feita através da ação celular Th-1 forte, capazes de fagocitar e destruir o bacilo pelo intermédio de citosinas como o TNF- α , INF- γ e espécies de oxigênio reativos (ROS) (Araújo 2003). Já a forma lepromatosa da doença, é descrita como tendo uma ação predominante de Th-2 humoral com produção de grandes quantidades de IgG ou IgM o que seria uma resposta não funcional contra um agente intracelular, tal como o *M. leprae* (Reibel, Cambau et al. 2015).

2.6.ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA HANSENÍASE

2.6.1. Epidemiologia da Hanseníase no Mundo

Em 1998 a OMS estipulou padrões epidemiológicos para classificar a hanseníase com relação ao grau de prevalência e de incidência, com isso consideraram que a área é hiperendêmica quando a prevalência estiver em mais de 20 casos/10.000 habitantes, muito alto quando 10-20 casos/10.000 habitantes, médio quando 1-5 casos/10.000 habitantes, baixo quando houver menos de 1 caso/10.000 habitantes. Quando se trata de casos novos indica-se que uma incidência de 4-6 casos/100.000 habitantes é considerada área hiperendêmica, 2-4 casos/100.000 habitantes considera-se muito alto, 1-2 novos casos/100.000 habitantes é considerado alto, considerado médio quando são detectados 0,2-1 novos casos/100.000 habitantes e é considerado baixo quando são detectados menos que 0,2 casos/100.000 habitantes (WHO 1998)

Foram registrados aproximadamente 250 mil casos de hanseníase em todo o mundo em 2012 (WHO 2013). Esse valor é bem menor que os valores relatados na década anterior, quando foram relatados cerca de 600 mil casos registrados em 2002, (Rodrigues and Lockwood 2011). Em 2013 foram registrados em todo o mundo 215 mil casos e 180 mil casos em 2014, estes

valores demonstram como o programa de eliminação da hanseníase tem diminuído o número de casos da doença no mundo (WHO 2015).

Apesar dessa diminuição gradativa, o continente asiático continua detectando o maior número de casos todos os anos, sendo 155 mil em 2013 e 116 mil em 2014, perfazendo uma taxa de incidência de 0,83 e 0,63/100.000 habitantes respectivamente nestes anos. Dos 155mil casos relatados no continente asiático em 2013, 126 mil foram encontrados na Índia o que torna este o país com o maior número de casos novos seguido pelo Brasil e Indonésia. As regiões do Pacífico Ocidental e Mediterrâneo Oriental são onde as taxas de detecção são menores entre todas as regiões. Segundo a OMS não há relatos de casos de hanseníase na região da Europa nos anos de 2013 e 2014. No continente africano o número de casos novos aumentou de 20.911 em 2013 para 22.722 em 2014 (WHO 2015).

Em relação aos casos de incapacitação, foram relatados em 2013 em todo o mundo 13.289 casos com grau II de incapacitação, destes quase 8.000 casos foram na Ásia, 2.552 na África, sendo uma taxa de 0,43/100.000 habitantes nestes continentes, este índice cai para 0,05 no Mediterrâneo Oriental e 0,02 na região do Pacífico Ocidental (WHO 2015).

Tabela 1. Prevalência de hanseníase registrada em 2014 e o número de novos casos detectados durante 2014 nas regiões de monitoramento da OMS (WHO, 2016).

Região	Prevalência		Novos casos	
	Número	Por 10.000 habitantes	Número	Por 100.000 habitantes
África	19.968	0,26	18.597	2,44
Américas	29.967	0,33	33.789	3,75
Mediterrâneo Oriental	2.212	0,04	2.342	0,38
Europa	-	-	-	-
Sudeste Asiático	119.478	0,63	154.834	8,12
Pacífico Ocidental	3.929	0,02	4.337	0,24
Total	174.554	0,25	213.899	3,00

2.6.2. Epidemiologia da Hanseníase no Brasil

Mesmo com todos os esforços da Organização Mundial de Saúde em tentar eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, o Brasil ainda continua a ser endêmico, sendo o segundo país mais afetado pela doença no mundo. Em 2014 foram notificados mais de 31.000 novos casos da doença no Brasil, comparando com os anos anteriores, observa-se uma diminuição gradativa, porém lenta, no número de novos casos (WHO 2015).

A região Centro Oeste notificou 5.871 novos casos ou uma taxa de 38,62 para cada 100 mil habitantes no ano de 2014 com uma prevalência de 3,93 casos para cada 10 mil habitantes. Destes novos casos, 77% foram MB e 361 casos em crianças menores de 15 anos. Com relação

a incapacitação foram registrados 326 indivíduos com incapacidade de grau II causado pela hanseníase (Brasil, 2014).

O Mato Grosso do Sul é o nono estado mais afetado do país em número de casos com 1.073, mas é o quarto em prevalência com 3,95 novos casos para 10 mil habitantes em 2014. Dos casos novos notificados em 2014, 57 foram registrados em crianças menores de 15 anos, 552 eram mulheres, 863 ou 81,7% foram MB, e 65 apresentaram incapacidade de grau II. Durante esse período também foram acompanhados 1.972 contatos de pacientes positivos. No geral o Mato Grosso do Sul apresentou grau médio de endemia com coeficiente geral de prevalência totalizando 3,95 casos para cada 10.000 habitantes, um número ainda distante da meta estipulada pela OMS (Brasil, 2014).

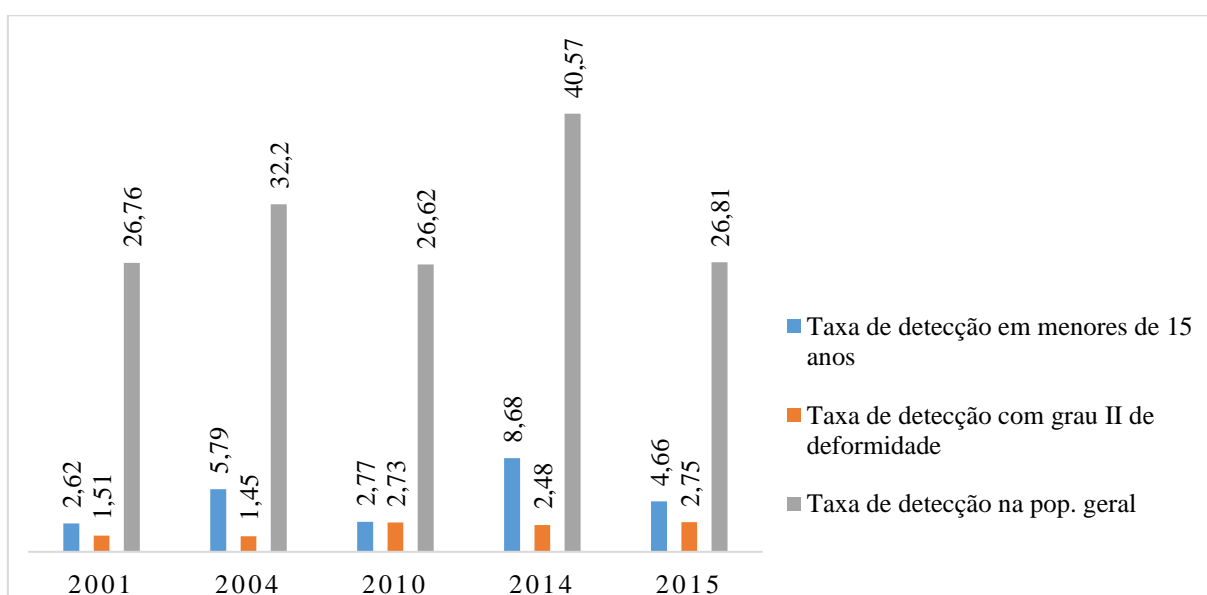


Figura 1. Gráfico de evolução das taxas epidemiológica no Mato Grosso do Sul nos anos 2001, 2004, 2010, 2014 e 2015. (Taxas de detecção por 100 mil habitantes) (Brasil, 2016).

A região mais afetada pela doença no Brasil é o Nordeste com mais de 13.000 novos casos registrados em 2014, seguido pela região norte onde foram registrados 6.113 novos casos. As áreas mais afetadas são os estados do Maranhão e Pará com mais de 3.600 e 3.400 novos casos registrados em 2014 respectivamente. As regiões Sul e Sudeste foram as que apresentaram os menores números de casos novos registrados, com 1.035 e 510 respectivamente. Os estados que menos apresentaram novos casos foram os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Com relação às incapacitações, foram relatados 2.039 casos no Brasil em 2014, sendo a grande maioria dos casos relatados em toda América (Brasil, 2014).

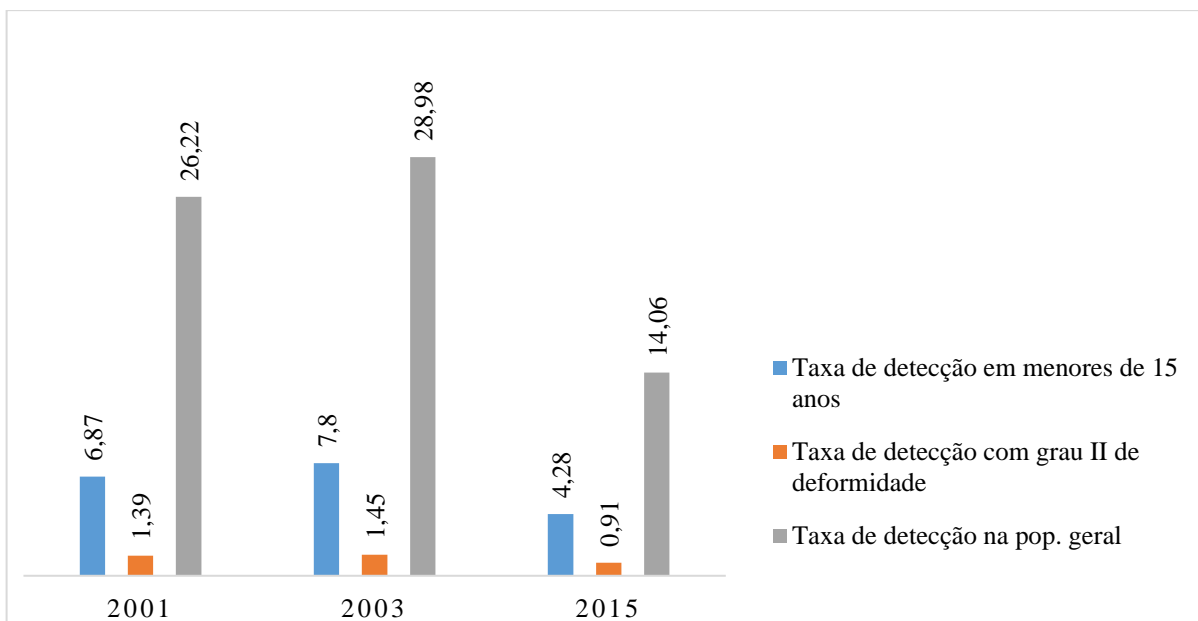


Figura 2. Gráfico de evolução das taxas epidemiológicas no Brasil nos anos 2001, 2003 e 2015. (Taxas de detecção por 100 mil habitantes) (Brasil, 2016).

2.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da hanseníase é basicamente clínico e realizado através dos dados semiológicos, sendo os métodos laboratoriais e outros métodos diagnósticos tidos como auxiliares, confirmatórios ou para a classificação da forma clínica da doença e dessa forma utilizada como base para o tratamento (Moschella 2004). Embora existam estudos envolvendo outros métodos diagnósticos modernos como a utilização de metodologias moleculares baseadas em PCR (Donoghue, Holton et al. 2001, Martinez, Britto et al. 2006) e testes baseados em sorologia como o teste rápido com a PGL-I (Buhner-Sekula, Cunha et al. 1998), os testes mais utilizados para a detecção da hanseníase são a baciloscopia e o exame histopatológico, mesmo estes métodos tendo baixa sensibilidade devido à dificuldade de detecção de bacilos, principalmente em indivíduos PB (Tsukamoto, Maeda et al. 2014).

2.7.1. Avaliação clínica

O diagnóstico clínico é feito através da avaliação física do paciente com suspeita da doença, a avaliação clínica do paciente é realizada seguindo os seguintes passos: Anamnese - onde serão coletadas informações relevantes sobre a história clínica e epidemiológica; Avaliação dermatológica – buscando alterações de pele com perda de sensibilidade características da doença; Avaliação neurológica – identificar alterações de espessamento de nervos, neurites, incapacidades e deformidades gerais; Classificação do grau de incapacidade; Diagnóstico de reações hansênicas e diagnóstico diferencial (Brasil, 2001)

O exame dermatoneurológico realizado durante a avaliação clínica tem por objetivo avaliar a sensibilidade térmica, tátil e hiperalgésica nas lesões de pele e dessa forma identificar neurites e comprometimento de nervos e troncos nervosos, além de incapacidades físicas (WHO, 2001). Durante a avaliação dermatológica é verificada a presença de lesões e identificado sua forma, número, dimensões e formato de bordas, também é realizada uma avaliação de sensibilidade nos olhos e membros além de força muscular (Brasil, 2001)

Durante a avaliação clínica é realizado a palpação de nervos com o objetivo de detectar alterações funcionais que podem ter sido ocasionadas pela hanseníase, nesta avaliação é observada a espessura, fibrose, nodulações e dor, isso é feito comparando se o nervo a ser avaliado com o seu contralateral. Os nervos a serem avaliados durante o exame clínico são: o nervo ulnar, o mediano, radial e radial cutâneo tibial posterior e o fibular comum. O nervo grande auricular e o nervo facial são nervos motores que não dão a possibilidade de palpação (Araújo, 2003).

2.7.2. Baciloscopia e Histologia

Dentre os diversos métodos descritos na literatura que são utilizados no auxílio do diagnóstico da hanseníase juntamente com a avaliação clínica, está a detecção direta de bacilos através de baciloscopia em um esfregaço de pele obtidos em áreas de lesões padrão para hanseníase. Na baciloscopia é utilizado o método de coloração de ZN em que os bacilos álcool-ácido resistentes são corados em vermelho (Lastória and Abreu 2014).

Para realização da baciloscopia é utilizado diretamente os esfregaços de raspados intradérmicos das lesões hansênicas ou de outros locais e lesões: lóbulos auriculares e/ou cotovelos. É um dos principais exames auxiliares ao diagnóstico além de ser importante na avaliação e confirmação de recidivas (Brasil, 2001). O resultado da baciloscopia é obtido através de um algoritmo de índice bacteriano (BI) que representará a carga bacteriana, sendo o resultado positivo para grupos MB e normalmente inconclusivo para grupos PB já que esse método possui baixa sensibilidade, ou seja, não detecta bacilos nestes indivíduos (Shepard and McRae 1968).

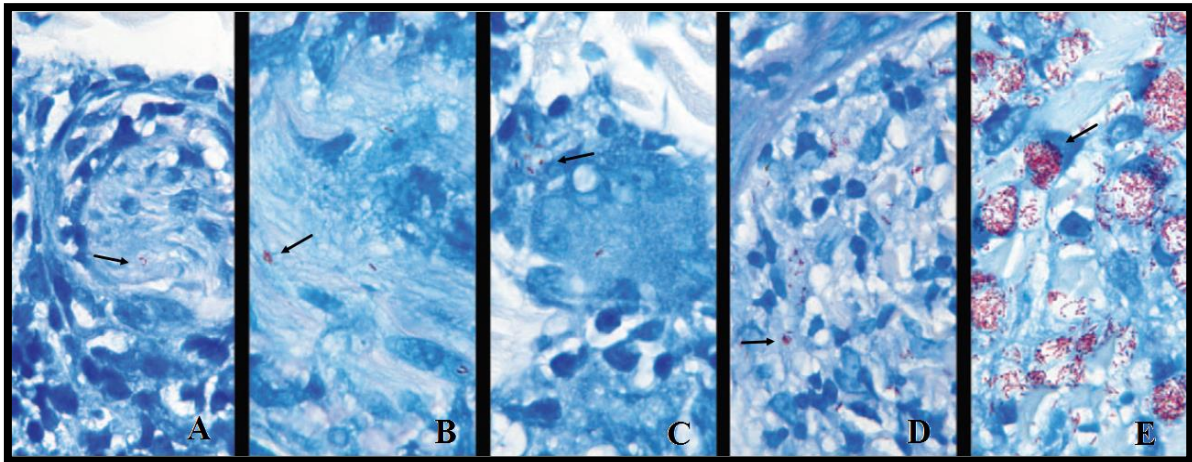


Figura 3. Baciloscopia de raspado de pele. A) hanseníase tuberculoide, B) hanseníase borderline tuberculoide, C) hanseníase borderline borderline, D) hanseníase borderline lepromatosa, E) hanseníase lepromatosa (Scollard, Adams et al. 2006).

Em complementaridade com a baciloscopia temos o exame histopatológico que é realizado com fragmentos de lesões de pele e nervos corados com hematoxilina-eosina. Na histopatologia com auxílio da clínica podem ser determinadas as formas TT, LL, BT, BB e BL (Ridley and Jopling 1966). Os achados mais comuns no exame histológico são granulomas com aspecto tuberculoide formados por células de Langerhans e bacilos escassos ou ausentes no polo TT. Presença de granuloma de células histocísticas, formação de células vacuoladas espumosas com presença de grande quantidade de bacilos e escassez de linfócitos no polo LL. A diferenciação entre o grupo BT e o grupo TT se dá pela presença da zona de Grenz subepidermal livre e diferencia-se do grupo BB pela presença de Langerhans multinucleadas, granulomas de células epitelióides e células gigantes cercadas por halos linfocitários, sendo no grupo BB evidenciada a presença de epitelióides bem desenvolvidos e escassez de células de Langerhans ou células gigantes multinucleadas. O subgrupo BL apresenta poucos linfócitos, macrófagos indiferenciados e infiltração linfocítica granulomatosa, além da apresentação de grande quantidade de bacilos neste polo. (Lastória and Abreu 2014).

2.7.3. Teste de Mitsuda

O teste de Mitsuda é baseado na detecção de imunidade celular onde para tal é utilizado uma suspensão de bacilos de *M. leprae* inativados, denominada lepromina, que é injetado via intradermal e avaliada a resposta após 21 dias. A resposta ao teste está associada ao grau de proteção que o indivíduo possui contra a doença, sendo que os indivíduos PB apresentam resposta mais forte e os indivíduos multibacilares muitas vezes não apresentam resposta visível (Goulart, Bernardes Souza et al. 2008), este aspecto da reação à lepromina pode ser evidenciado em um relato de caso de hanseníase com apresentação de lesão oral, que é normalmente relatada

em casos multibacilares, porem neste caso o teste de índice bacteriano (BI), qPCR e BAAR foram negativos e o teste anti-PGL-I positivo, o teste de Mitsuda apresentou resultado forte positivo (da Silva Martinez, Nahas et al. 2011).

2.7.4. Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de PCR para detecção da hanseníase vem sendo estudada com bastante frequência, além de auxiliar na detecção da hanseníase, a utilização da PCR também traz outras informações importantes sobre a infecção. Existe uma variação nos resultados de detecção de hanseníase pela PCR, essa variação está relacionada com a técnica de amplificação e o *primer* utilizado (Goulart and Goulart 2008).

Um estudo realizado por Donoghue, et al. (2001), avaliou *primers* para um antígeno de 18 kDa e comparou com *primers* de um gene de sequência repetitiva com produto de 129 pb, demonstrando sensibilidade 100 vezes maior em comparação com o antígeno de 18 kDa, os testes foram feitos com amostras de pacientes com hanseníase Virchowiana e amostras de restos mortais humanos com indicações de hanseníase, este resultado demonstra que os *primers* utilizados possuem potencial para detecção da hanseníase em pacientes com baixas quantidades de bacilos ou em caso de DNA danificado (Kang, Kim et al. 2003).

Há indicações de que a pode ser detectado a presença de bacilos em lesões de pele através de RT-PCR, para chegar a esta conclusão um estudo foi realizado utilizando biópsias de lesões de pacientes que apresentavam T1R com taxa de detecção de 65% para um antígeno denominado Ag 85 e de 100% para o 16s rRNA, mas essa taxa é bem menor em pacientes que não apresentavam resposta reacional, este estudo concluiu que o Ag 85 pode ser um agente precipitante da T1R (Save, Dighe et al. 2016).

Haja visto a grande similaridade entre as espécies de micobactérias, já que compartilham diversos genes, foi realizado estudo em que utilizou-se da ferramenta de reação em cadeia da polimerase-polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) em que os *primers* utilizados detectavam a HSP 65, para a análise de restrição foram utilizadas as enzimas de restrição *HhaI*, *BSTUI* e *MboI*. Os tamanhos de bandas foram comparados com as obtidas em amostras de DNA do Bacillus de Calmete-Guerin. Em resultado observou-se as diferenças entre os tamanhos de bandas e dessa forma concluindo que pode se obter a detecção e diferenciação de infecções com *M. leprae* (Zhao, Liu et al. 2015).

2.7.5. Testes Sorológicos

Mesmo a baciloscopia e o exame histopatológico tendo boa capacidade para detecção da hanseníase em indivíduos MB, ainda busca-se por um método que possua boa sensibilidade além de especificidade para detectar também indivíduos do polo PB. (Tsukamoto, Maeda et al. 2014).

A descoberta do cultivo do bacilo da hanseníase em tatus (*Dasypus novemcinctus*) abriu uma nova perspectiva para estudos com o bacilo e a posterior descoberta de proteínas que pudessem ser utilizadas como base para o diagnóstico sorológico da hanseníase (Kirchheimer and Storrs 1971, Kumar, Parkash et al. 2014). Em 1980 foi descoberto um glicolípido fenólico denominado (PGL-I) que foi descrito por ser específico para *M. leprae* (Hunter and Brennan 1981). Um estudo realizado em 1983, com a PGL-I, demonstrou que esta proteína possui boa especificidade detectando imunoglobulinas do tipo M (IgM) que não houve reação cruzada com outras Micobactérias, posteriormente essa proteína veio a se tornar a base do primeiro método sorológico para detecção da hanseníase (Cho, Yanagihara et al. 1983), o teste é baseado na aglutinação de partículas em gelatina e tem sido utilizado como ferramenta para monitoramento de áreas endêmicas, predição de diagnóstico em pacientes de risco e monitoramento da poliquimioterapia (Izumi, Fujiwara et al. 1990).

Pacientes tratados com PQT e que receberam diagnóstico através da detecção de imunidade humoral contra a PGL-I possuem uma taxa de decaimento de anticorpos em cerca de 25-30% ao ano, isso por que conforme o bacilo vai sendo eliminado do organismo também ocorre a diminuição da produção da PGL-I e automaticamente a diminuição da produção de anticorpos (Roche, Britton et al. 1993). Monitorar os níveis de anticorpos contra a PGL-I é um importante dado não apenas para diagnóstico, mas também para classificação da doença, risco de transmissão e reconhecimento de casos multibacilares entre os contatos. Um método que possa ser executado facilmente sem a utilização de equipamentos é importante para que possa ser realizado imediatamente no momento do exame clínico em áreas endêmicas. (Buhner-Sekula, Cunha et al. 1998).

Em 1998 um método de vareta (*dipstick test*) para detecção de anticorpos para o PGL-I foi criado (InBios Leprosy Detect™) O teste possui duas bandas, sendo uma para controle interno e outra contendo o epítipo imunodominante sintético da PGL-I (3,6-di-O-metil- β -D-glucopiranosilo (1 \rightarrow 4) 2,3-dio-methylrhamnopyranoside (NDO), que se comporta da mesma forma quando ligado a albumina de soro bovino (BSA) (Spencer and Brennan 2011). O teste foi capaz de detectar 40,4% dos pacientes utilizando soro e 39,9% dos pacientes utilizando sangue. Este teste se apresentou como um teste bastante similar ao ELISA demonstrando uma

capacidade de detecção 96,5% da capacidade de detecção através do ELISA (Buhner-Sekula, Cunha et al. 1998, Buhner-Sekula, Cunha et al. 2001).

Um novo teste para hanseníase utilizando a PGL-I foi criado em 2003, dessa vez um teste rápido denominado ML Flow, um teste de fluxo lateral que faz a detecção de IgM contra PGL-I (NDO) em cerca de 10 minutos (CTK OnSite Leprosy Ab Rapid Test). O ML Flow demonstrou concordância de 91% com o teste de ELISA, levando em consideração a classificação, este teste foi capaz de detectar 97,4% dos pacientes MB e 40% dos pacientes com a hanseníase PB, com uma sensibilidade de mais de 97% e especificidade de 90,2%. O ML Flow é um teste barato e rápido de ser realizado, além disso seus componentes possuem alta estabilidade e dessa forma ele pode ser utilizado em áreas remotas para classificação de pacientes e levantamentos epidemiológicos (Buhner-Sekula, Smits et al. 2003).

Duas proteínas foram descritas por serem antigênicas e por terem potencial para detecção da hanseníase, a ML0405 e ML2331, estas duas potencialmente detectavam pacientes BL e LL através da detecção de IgG (Reece, Ireton et al. 2006). Posteriormente a conjugação das duas proteínas deram origem a Instituto de Pesquisa em Doenças Infecciosas diagnóstico-1 (LID-1) (Duthie, Goto et al. 2007).

Posteriormente foi criado em parceria com a empresa OrangeLife (Rio de Janeiro, BR) um teste rápido em que é utilizado a PGL-I-NDO e o LID-1, OrangeLife NDO-LID®, este teste foi capaz de detectar 81,7% de pacientes MB e 32,3% dos pacientes PB demonstrando melhor capacidade de detecção que o teste diagnóstico padrão, o MLflow, que tem como base a PGL-I (Duthie, Balagon et al. 2014).

Tabela 2. Taxas de sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos disponíveis comercialmente para o diagnóstico da hanseníase em pacientes paucibacilares, multibacilares e hanseníase geral.

Teste	Sensibilidade PB	Sensibilidade MB	Sensibilidade Geral	Especificidade Geral	Referência
InBios Leprosy Detect™	22,30%	85,10%	85%	93,70%	Buhner-Sekula, et al. 2001
ML Flow-NDO	40,00%	97,40%	97%	90,02%	Buhner-Sekula, et al. 2003
OrangeLife NDO-LID®	32,30%	81,70%	95,50%	25,00%	Duthie, et al., 2014

Legenda: PB- hanseníase paucibacilar. MB- hanseníase multibacilar.

2.8. PROTEÍNAS DE *M. leprae* NO DIAGNÓSTICO DE HANSENÍASE.

O diagnóstico específico e sensível para a hanseníase é extremamente importante para que se consiga eliminá-la como problema de saúde pública, esse teste deve detectar todos os pacientes positivos e descartar todos os pacientes negativos, até o momento foram estudadas diversas proteínas com potencial para este fim e, acredita-se que a tecnologia de proteínas recombinantes possam auxiliar no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico (Kumar, Parkash et al. 2014).

Após a descoberta da PGL-I e do avanço da genética foram realizados estudos com diversas outras proteínas em busca de melhorar ou substituir o diagnóstico com a PGL-I (Geluk, Klein et al. 2005), apesar do PGL-I ser considerado como o melhor teste e o padrão para o diagnóstico antigênico da hanseníase, o PGL-I, tem sido satisfatório apenas na detecção de indivíduos MB, com detecção de soropositividade entre 70 e 90%, as taxas encontradas para detecção da hanseníase PB são muito baixas, entre 15 e 40% (Young and Buchanan 1983, Kai, Nguyen Phuc et al. 2008, Moura, Calado et al. 2008), isso ocorre por que a detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I está relacionado com a carga bacilar do paciente, ou seja, quanto maior a carga bacilar, maior a produção de anti PGL-I (Porto, Figueira et al. 2015).

Outra proteína com potencial capacidade para detecção de pacientes com hanseníase é a proteína maior de membrana II (MMP-II), uma proteína de 18,2 kDa codificada pelo gene denominado *bfrA*, locus ML2038c. A MMP-II está entre as principais proteínas de membrana no *M. leprae* sendo encontrada em diversas outras espécies do gênero (Pessolani, Smith et al. 1994) no estudo realizado por Maeda a MMP-II demonstrou capacidade de detecção de indivíduos PB e MB, sendo que as taxas de detecção não passam de 39% para PB, uma taxa de detecção ainda muito baixa (Maeda, Mukai et al. 2007).

No estudo realizado por Tsukamoto, em 2014, foi realizado testes em que se utilizou de uma proteína denominada Proteína maior de membrana – I (MMP-I) para melhorar a capacidade da MMP-II em detectar pacientes com hanseníase PB (Tsukamoto, Maeda et al. 2014). A MMP-I é uma proteína expressa em *M. leprae* de 35 kDa que possui 21 peptídeos e 307 aminoácidos, cujo sua função ainda não está elucidada (Winter, Triccas et al. 1995). O resultado do estudo de Tsukamoto quando testados soros de pacientes positivos utilizando apenas a MMP-I a taxa de detecção ficou em 86% para MB e 25 % para indivíduos PB, já utilizando com a MMP-II os resultados foram 80% em MB e 41% em PB, quando testados os soros utilizando as duas proteínas juntas, MMP-I e MMP-II, os resultados demonstraram taxas de detecção de 94,4% em indivíduos MB e 39,7 em indivíduos PB, sendo estes resultados,

apesar de demonstrar capacidade de detecção de ambas as proteínas, ainda não são suficientes para detecção desejável para indivíduos PB (Tsukamoto, Maeda et al. 2014).

2.8.1. Proteína ML0234 (*Lsr2*)

A *Lsr2* codifica uma proteína tida como imunodominante no bacilo causador da hanseníase, esta proteína tem um tamanho de 15 kDa (Laal, Sharma et al. 1991) e até o momento foi encontrada em todas as Micobactérias que tiveram seu sequenciamento completo, é uma proteína essencial para sobrevivência do *M. leprae* normalmente é expressa em condições de estresse (Saini, Prasad et al. 2013).

Já foi relatado que essa proteína é reconhecida por pacientes diagnosticados com hanseníase (Laal, Sharma et al. 1991, Chaduvula, Murtaza et al. 2012), em outro estudo ela também foi testada em cultura de células mononucleares de sangue periférico quanto ao estímulo de proliferação destas células quanto a indução a liberação de INF- γ , os resultados deste estudo demonstraram que a proteína recombinante de *Lsr2* estimulou tanto a proliferação destas células quanto a liberação de INF- γ pelas mesmas (Saini, Prasad et al. 2013).

2.8.2. Proteína ML1358 (*TlyA*)

A proteína codificada pelo gene *TlyA* é descrita como uma hemolisina de 268 aminoácidos com uma massa aproximada de 28 kDa, está presente em diversas espécies patogênicas de Micobactérias incluindo o *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. leprae* (Wren, Stabler et al. 1998, Kumar, Mittal et al. 2015). Esta proteína foi estudada e demonstrou reconhecer 60% dos pacientes com a forma BL e BB (Bobosha, Tang et al. 2012).

2.8.3. Proteína ML1214 (p60-family protein)

A proteína codificada pelo gene ML1214 possui 212 aminoácidos e é da família de proteínas-p60 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_301879.) Esta proteína induziu a produção de INF- γ em 69% dos pacientes BB e BL (Bobosha, Tang et al. 2012). Alguns agentes relacionados a virulência, como o caso da ML1214, possuem maior capacidade de induzir resposta de células T e dessa forma estimulam o sistema imune fazendo com que estas proteínas sejam mais facilmente reconhecidas e conseqüentemente potenciais para detecção da hanseníase, além da ML1214, a proteína codificada pelo gene ML1358 também faz parte dessa classe (Kumar, Parkash et al. 2014).

2.8.4. Proteína ML2055

Um estudo realizado com pacientes positivos para hanseníase, pacientes saudáveis de áreas endêmicas e pacientes saudáveis de áreas com baixa prevalência da doença foi realizado a estimulação de células com diversos peptídeos da ML2055 *in vitro* demonstrou que vários desses peptídeos eram capazes de estimular células de pacientes positivos a produzis INF- γ , indicando que houve estímulo anterior por esta sequência peptídica e conseqüentemente reconhecimento deste pelos linfócitos T do indivíduo (Bobosha, Tang et al. 2012).

2.8.5. Peptídeos de *M. leprae*

Um estudo realizado em 2012 analisou 29 peptídeos de provenientes de 6 proteínas de *M. leprae* (ML0885, ML1214, ML1358, ML1811, ML1812 e ML2055), sendo 21 peptídeos relacionados ao MHC-I e 8 peptídeos ao MHC-II, foram avaliados quanto as respostas à produção de INF- γ , como resultado destacou-se os peptídeos p35 de ML2055 que induziu a produção de altas quantidades de INF- γ em pacientes TT, também destacou-se os peptídeos p20 e p24 de ML1358 por também terem induzindo resposta de células mononucleares periféricas a INF- γ . Importante salientar que neste estudo, os peptídeos não estimularam resposta em pacientes saudáveis o que indica que não houve reações cruzadas (Bobosha, Tang et al. 2012). O mesmo tipo de estudo relatado anteriormente foi realizado com peptídeos da proteína codificada pelo gene *Lsr2* de *M. leprae*, que demonstrou estimular a proliferação de células mononucleares periféricas e a produção de INF- γ pelo mesmo tipo de células em pacientes com hanseníase (Saini, Prasad et al. 2013).

A grande vantagem da utilização de peptídeos é que estes induzem com menor frequência reações cruzadas em comparação com o uso de proteínas. Por outro lado, os peptídeos isolados tem uma maior restrição em relação aos alelos do MHC reconhecidos por células T, ou seja acabam se tornando menos sensíveis e com menor capacidade de detectar populações diferentes. A utilização de epitopos de diversas proteínas se mostraram capazes de detectar pacientes com hanseníase através da análise da indução da produção de INF- γ e outros marcadores, demonstrando que podem ser úteis na detecção da hanseníase (Bobosha, Tang et al. 2012).

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

Produzir um polipeptídeo sintético recombinante com potencial para ser utilizado em um teste sorológico para o diagnóstico da hanseníase.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Desenhar *in silico* um polipeptídeo unindo 15 epítopos de *M. leprae* que possuam potencial para identificar imunoglobulinas de *M. leprae*;

-Avaliar *in silico* parâmetros físico-químicos, estruturais e imunológicos deste polipeptídeo levando em consideração sua utilização para diagnóstico sorológico da hanseníase;

-Clonar, expressar, caracterizar e purificar o polipeptídeo de *M. leprae* em *E. coli* utilizando o vetor de expressão pAE;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, C. J., J. A. Barreto, L. Fogagnolo, L. A. Contin and P. W. Nassif (2010). "[Evaluation of the degree of incapacity of patients with a diagnosis of leprosy at a dermatology service in the state of São Paulo]." Rev Soc Bras Med Trop **43**(4): 460-461.

Araújo, M. G. (2003). "[Leprosy in Brazil]." Rev Soc Bras Med Trop **36**(3): 373-382.

Bashiri, G. and E. N. Baker (2015). "Production of recombinant proteins in Mycobacterium smegmatis for structural and functional studies." Protein Sci **24**(1): 1-10.

Blackwell, J. M., S. E. Jamieson and D. Burgner (2009). "HLA and infectious diseases." Clin Microbiol Rev **22**(2): 370-385, Table of Contents.

Bobosha, K., S. T. Tang, J. J. van der Ploeg-van Schip, Y. Bekele, M. V. Martins, O. Lund, K. L. Franken, S. Khadge, M. A. Pontes, S. Goncalves Hde, J. Hussien, P. Thapa, C. B. Kunwar, D. A. Hagge, A. Aseffa, M. C. Pessolani, G. M. Pereira, T. H. Ottenhoff and A. Geluk (2012). "Mycobacterium leprae virulence-associated peptides are indicators of exposure to M. leprae in Brazil, Ethiopia and Nepal." Mem Inst Oswaldo Cruz **107 Suppl 1**: 112-123.

Braga, A. F., D. F. Moretto, P. Gigliotti, M. Peruchi, F. R. Vilani-Moreno, A. P. Campanelli, A. C. Latini, A. Iyer, P. K. Das and V. N. Souza (2015). "Activation and cytokine profile of monocyte derived dendritic cells in leprosy: in vitro stimulation by sonicated Mycobacterium leprae induces decreased level of IL-12p70 in lepromatous leprosy." Mem Inst Oswaldo Cruz.

Brasil (2001). "Controle da Hanseníase na Atenção Básica. Guia Prático para Profissionais da Equipe de Saúde da Família." Série A. Normas e Manuais Técnicos, n. 111.

Brasil (2014). "Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões". SINAN-Ministério da saúde.

Brasil (2016). "Registro ativo: número e percentual, Casos novos de hanseníase: número, coeficiente e percentual, faixa etária, classificação operacional, sexo, grau de incapacidade, contatos examinados, por estados e regiões". SINAN-Ministério da Saúde.

Brett, S. J., P. Draper, S. N. Payne and R. J. Rees (1983). "Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis." Clin Exp Immunol **52**(2): 271-279.

Buhrer-Sekula, S., M. G. Cunha, W. A. Ferreira and P. R. Klatser (1998). "The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation." FEMS Immunol Med Microbiol **21**(3): 197-201.

Buhrer-Sekula, S., M. G. Cunha, N. T. Foss, L. Oskam, W. R. Faber and P. R. Klatser (2001). "Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse." Trop Med Int Health **6**(4): 317-323.

Buhrer-Sekula, S., H. L. Smits, G. C. Gussenhoven, J. van Leeuwen, S. Amador, T. Fujiwara, P. R. Klatser and L. Oskam (2003). "Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy." J Clin Microbiol **41**(5): 1991-1995.

Cho, S. N., D. L. Yanagihara, S. W. Hunter, R. H. Gelber and P. J. Brennan (1983). "Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy." Infect Immun **41**(3): 1077-1083.

Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." Nature **393**(6685): 537-544.

Cole, S. T., K. Eiglmeier, J. Parkhill, K. D. James, N. R. Thomson, P. R. Wheeler, N. Honoré, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. M. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell, A. Fraser, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, C. Lacroix, J. Maclean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, S. Simon, M. Simmonds, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, S. Whitehead, J. R. Woodward and B. G. Barrell (2001). "Massive gene decay in the leprosy bacillus." Nature **409**(6823): 1007-1011.

Cortela, D. C., A. L. de Souza Junior, M. C. Virmond and E. Ignotti (2015). "Inflammatory Mediators of Leprosy Reactional Episodes and Dental Infections: A Systematic Review." Mediators Inflamm **2015**: 548540.

Cunha, C., V. L. Pedrosa, L. C. Dias, A. Braga, A. Chrusciak-Talhari, M. Santos, G. O. Penna, S. Talhari and C. Talhari (2015). "A historical overview of leprosy epidemiology and control activities in Amazonas, Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **48** Suppl 1: 55-62.

da Cunha, A. Z. S. (2002). "Hanseníase: aspectos da evolução do diagnóstico, tratamento e controle." Ciênc. saúde coletiva **vol.7 no.2** São Paulo.

da Silva, G. B., E. D. F. Daher, R. d. J. Pires, E. D. B. Pereira, G. C. Meneses, S. M. H. A. Araújo and E. J. G. Barros (2015). "Leprosy nephropathy: a review of clinical and

- histopathological features." Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo **57**(1): 15-20.
- Donoghue, H. D., J. Holton and M. Spigelman (2001). "PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA." J Med Microbiol **50**(2): 177-182.
- Duarte-Cunha, M., G. Marcelo da Cunha and R. Souza-Santos (2015). "Geographical heterogeneity in the analysis of factors associated with leprosy in an endemic area of Brazil: are we eliminating the disease?" BMC Infect Dis **15**: 196.
- Duthie, M. S., W. Goto, G. C. Ireton, S. T. Reece, L. P. Cardoso, C. M. Martelli, M. M. Stefani, M. Nakatani, R. C. de Jesus, E. M. Netto, M. V. Balagon, E. Tan, R. H. Gelber, Y. Maeda, M. Makino, D. Hoft and S. G. Reed (2007). "Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy." Clin Vaccine Immunol **14**(11): 1400-1408.
- Duthie, M. S., M. F. Balagon, A. Maghanoy, F. M. Orcullo, M. Cang, R. F. Dias, M. Collovati and S. G. Reed (2014). "Rapid Quantitative Serological Test for Detection of Infection with *Mycobacterium leprae*, the Causative Agent of Leprosy." Journal of Clinical Microbiology **52**(2): 613-619.
- Duthie, M. S., F. M. Orcullo, J. Abbelana, A. Maghanoy and M. F. Balagon (2016). "Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy." Appl Microbiol Biotechnol **100**(7): 3267-3275.
- Eidt, L. M. (2004). "Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira." Saúde Sociologia **13**: 76-88.
- Engers, H. D., B. R. Bloom and T. Godal (1985). "Monoclonal antibodies against mycobacterial antigens." Immunol Today **6**(12): 345-348.
- Geluk, A., M. R. Klein, K. L. Franken, K. E. van Meijgaarden, B. Wieles, K. C. Pereira, S. Buhner-Sekula, P. R. Klatser, P. J. Brennan, J. S. Spencer, D. L. Williams, M. C. Pessolani, E. P. Sampaio and T. H. Ottenhoff (2005). "Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection." Infect Immun **73**(9): 5636-5644.
- Goulart, I. M. and L. R. Goulart (2008). "Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease." Arch Dermatol Res **300**(6): 269-290.
- Goulart, I. M., G. O. Penna and G. Cunha (2002). "[Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*]." Rev Soc Bras Med Trop **35**(4): 365-375.
- Goulart, I. M. B., D. O. Bernardes Souza, C. R. Marques, V. L. Pimenta, M. A. Gonçalves and L. R. Goulart (2008). "Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts." Clinical and Vaccine Immunology : CVI **15**(1): 101-105.
- Han, X. Y., Y.-H. Seo, K. C. Sizer, T. Schoberle, G. S. May, J. S. Spencer, W. Li and R. G. Nair (2008). "A New *Mycobacterium* Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy." American Journal of Clinical Pathology **130**(6): 856-864.
- Heather, J. M. and B. Chain (2016). "The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA." Genomics **107**(1): 1-8.

- Hunter, S. W. and P. J. Brennan (1981). "A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity." J Bacteriol **147**(3): 728-735.
- Izumi, S., T. Fujiwara, M. Ikeda, Y. Nishimura, K. Sugiyama and K. Kawatsu (1990). "Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field." J Clin Microbiol **28**(3): 525-529.
- Jopling, W. H. (1971). "Leprosy." Practitioner **207**(238): 164-172.
- Jurado, F., O. Rodriguez, J. Novales, G. Navarrete and M. Rodriguez (2015). "Lucio's leprosy: A clinical and therapeutic challenge." Clinics in Dermatology **33**(1): 66-78.
- Kai, M., N. H. Nguyen Phuc, T. H. Hoang Thi, A. H. Nguyen, Y. Fukutomi, Y. Maeda, Y. Miyamoto, T. Mukai, T. Fujiwara, T. T. Nguyen and M. Makino (2008). "Serological diagnosis of leprosy in patients in vietnam by enzyme-linked immunosorbent assay with *Mycobacterium leprae*-derived major membrane protein II." Clin Vaccine Immunol **15**(12): 1755-1759.
- Kang, T. J., S. K. Kim, S. B. Lee, G. T. Chae and J. P. Kim (2003). "Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*." Clin Exp Dermatol **28**(4): 420-424.
- Kim, H. J., K. Prithviraj, N. Groathouse, P. J. Brennan and J. S. Spencer (2013). "Gene Expression Profile and Immunological Evaluation of Unique Hypothetical Unknown Proteins of *Mycobacterium leprae* by Using Quantitative Real-Time PCR." Clinical and Vaccine Immunology : CVI **20**(2): 181-190.
- Kirchheimer, W. F. and E. E. Storrs (1971). "Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo." Int J Lepr Other Mycobact Dis **39**(3): 693-702.
- Kumar, A., O. Parkash and B. K. Girdhar (2014). "Analysis of antigens of *Mycobacterium leprae* by interaction to sera IgG, IgM, and IgA response to improve diagnosis of leprosy." Biomed Res Int **2014**: 283278.
- Kumar, B., S. Dogra and I. Kaur (2004). "Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India." Int J Lepr Other Mycobact Dis **72**(2): 125-133.
- Laal, S., Y. D. Sharma, H. K. Prasad, A. Murtaza, S. Singh, S. Tangri, R. S. Misra and I. Nath (1991). "Recombinant fusion protein identified by lepromatous sera mimics native *Mycobacterium leprae* in T-cell responses across the leprosy spectrum." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(3): 1054-1058.
- Lastória, J. C. and M. A. Abreu (2014). "Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects--part 2." An Bras Dermatol **89**(3): 389-401.
- Lastória, J. C. and M. A. Abreu (2014). "Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1." An Bras Dermatol **89**(2): 205-218.
- Maeda, Y., T. Mukai, M. Kai, Y. Fukutomi, H. Nomaguchi, C. Abe, K. Kobayashi, S. Kitada, R. Maekura, I. Yano, N. Ishii, T. Mori and M. Makino (2007). "Evaluation of major membrane protein-II as a tool for serodiagnosis of leprosy." FEMS Microbiol Lett **272**(2): 202-205.
- Martinez, A. N., C. F. Britto, J. A. Nery, E. P. Sampaio, M. R. Jardim, E. N. Sarno and M. O. Moraes (2006). "Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy." J Clin Microbiol **44**(9): 3154-3159.

- Mattos, K. A., V. C. Oliveira, M. Berrêdo-Pinho, J. J. Amaral, L. C. Antunes, R. C. Melo, C. C. Acosta, D. F. Moura, R. Olmo, J. Han, P. S. Rosa, P. E. Almeida, B. B. Finlay, C. H. Borchers, E. N. Sarno, P. T. Bozza, G. C. Atella and M. C. Pessolani (2014). "Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment." Cell Microbiol **16**(6): 797-815.
- Monot, M., N. Honore, T. Garnier, R. Araoz, J. Y. Coppee, C. Lacroix, S. Sow, J. S. Spencer, R. W. Truman, D. L. Williams, R. Gelber, M. Virmond, B. Flageul, S. N. Cho, B. Ji, A. Paniz-Mondolfi, J. Convit, S. Young, P. E. Fine, V. Rasolofoa, P. J. Brennan and S. T. Cole (2005). "On the origin of leprosy." Science **308**(5724): 1040-1042.
- Montoya, D., D. Cruz, R. M. Teles, D. J. Lee, M. T. Ochoa, S. R. Krutzik, R. Chun, M. Schenk, X. Zhang, B. G. Ferguson, A. E. Burdick, E. N. Sarno, T. H. Rea, M. Hewison, J. S. Adams, G. Cheng and R. L. Modlin (2009). "Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy." Cell Host Microbe **6**(4): 343-353.
- Moschella, S. L. (2004). "An update on the diagnosis and treatment of leprosy." J Am Acad Dermatol **51**(3): 417-426.
- Moura, R. S., K. L. Calado, M. L. Oliveira and S. Buhrer-Sekula (2008). "Leprosy serology using PGL-I: a systematic review." Rev Soc Bras Med Trop **41** Suppl 2: 11-18.
- Nagai, H., Y. Nukaga, K. Saeki and A. Akabayashi (2009). "Self-regulation of recombinant DNA technology in Japan in the 1970s." Hist Sci (Tokyo) **19**(1): 1-18.
- Nsagha, D. S., E. A. Bamgboye, J. C. Assob, A. L. Njunda, H. L. Kamga, A. C. Zoung-Kanyi Bissek, E. N. Tabah, A. B. Oyediran and A. K. Njamnshi (2011). "Elimination of leprosy as a public health problem by 2000 AD: an epidemiological perspective." Pan Afr Med J **9**: 4.
- Okada, S., J. Komura and M. Nishiura (1978). "Mycobacterium leprae found in epidermal cells by electron microscopy." Int J Lepr Other Mycobact Dis **46**(1): 30-34.
- Parise-Fortes, M. R., J. C. Lastória, S. A. Marques, M. S. Putinatti, H. O. Stolf, M. E. Marques and V. Haddad (2014). "Lepromatous leprosy and perianal tuberculosis: a case report and literature review." J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis **20**: 38.
- Pessolani, M. C., D. R. Smith, B. Rivoire, J. McCormick, S. A. Hefta, S. T. Cole and P. J. Brennan (1994). "Purification, characterization, gene sequence, and significance of a bacterioferritin from Mycobacterium leprae." J Exp Med **180**(1): 319-327.
- Porto, A. C., R. B. Figueira, J. A. Barreto and J. R. Lauris (2015). "Evaluation of the social, clinical and laboratorial profile of patients diagnosed with leprosy in a reference center in São Paulo." An Bras Dermatol **90**(2): 169-177.
- Reece, S. T., G. Ireton, R. Mohamath, J. Guderian, W. Goto, R. Gelber, N. Groathouse, J. Spencer, P. Brennan and S. G. Reed (2006). "ML0405 and ML2331 Are Antigens of Mycobacterium leprae with Potential for Diagnosis of Leprosy." Clinical and Vaccine Immunology **13**(3): 333-340.
- Reibel, F., E. Cambau and A. Aubry (2015). "Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy." Med Mal Infect **45**(9): 383-393.
- Ridley, D. S. and W. H. Jopling (1966). "Classification of leprosy according to immunity. A five-group system." Int J Lepr Other Mycobact Dis **34**(3): 255-273.
- Robbins, G., V. M. Tripathy, V. N. Misra, R. K. Mohanty, V. S. Shinde, K. M. Gray and M. D. Schug (2009). "Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.)." PLoS ONE **4**(5): e5669.

- Roche, P. W., W. J. Britton, S. S. Failbus, K. D. Neupane and W. J. Theuvenet (1993). "Serological monitoring of the response to chemotherapy in leprosy patients." Int J Lepr Other Mycobact Dis **61**(1): 35-43.
- Rodrigues, L. C. and D. N. j. Lockwood (2011). "Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps." Lancet Infect Dis **11**(6): 464-470.
- Saini, C., H. K. Prasad, R. Rani, A. Murtaza, N. Misra, N. P. Shanker Narayan and I. Nath (2013). "Lsr2 of Mycobacterium leprae and its synthetic peptides elicit restitution of T cell responses in erythema nodosum leprosum and reversal reactions in patients with lepromatous leprosy." Clin Vaccine Immunol **20**(5): 673-682.
- Save, M. P., A. R. Dighe, M. Natrajan and V. P. Shetty (2016). "Association of viable Mycobacterium leprae with Type 1 reaction in leprosy." Lepr Rev **87**(1): 78-92.
- Scollard, D. M., L. B. Adams, T. P. Gillis, J. L. Krahenbuhl, R. W. Truman and D. L. Williams (2006). "The continuing challenges of leprosy." Clin Microbiol Rev **19**(2): 338-381.
- Sharma, I., A. Singh, A. K. Mishra, L. C. Singh, V. Ramesh and S. Saxena (2015). "Is CXCL10/CXCR3 axis overexpression a better indicator of leprosy type 1 reaction than inducible nitric oxide synthase?" Indian J Med Res **142**(6): 681-689.
- Shepard, C. C. (1960). "THE EXPERIMENTAL DISEASE THAT FOLLOWS THE INJECTION OF HUMAN LEPROSY BACILLI INTO FOOT-PADS OF MICE." J Exp Med **112**(3): 445-454.
- Shepard, C. C. and D. H. McRae (1968). "A method for counting acid-fast bacteria." Int J Lepr Other Mycobact Dis **36**(1): 78-82.
- Silva Sobrinho, R. A., T. A. Mathias, E. A. Gomes and P. B. Lincoln (2007). "Evaluation of incapacity level in leprosy: a strategy to sensitize and train the nursing team." Rev Lat Am Enfermagem **15**(6): 1125-1130.
- Spencer, J. S. and P. J. Brennan (2011). "The role of Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy." Lepr Rev **82**(4): 344-357.
- Spierings, E., T. de Boer, B. Wieles, L. B. Adams, E. Marani and T. H. Ottenhoff (2001). "Mycobacterium leprae-specific, HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism of nerve damage in leprosy." J Immunol **166**(10): 5883-5888.
- Steinman, R. M. and H. Hemmi (2006). "Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity." Curr Top Microbiol Immunol **311**: 17-58.
- Talhari, C., S. Talhari and G. O. Penna (2015). "Clinical aspects of leprosy." Clin Dermatol **33**(1): 26-37.
- Trindade, M. A. B., G. Benard, S. Ura, C. C. Ghidella, J. C. R. Avelleira, F. R. Vianna, A. B. Marques, B. Naafs and R. N. Fleury (2010). "Granulomatous Reactivation during the Course of a Leprosy Infection: Reaction or Relapse." PLoS Neglected Tropical Diseases **4**(12): e921.
- Tsukamoto, Y., Y. Maeda and M. Makino (2014). "Evaluation of major membrane protein-I as a serodiagnostic tool of pauci-bacillary leprosy." Diagn Microbiol Infect Dis **80**(1): 62-65.
- van Beers, S. M., M. Y. de Wit and P. R. Klatser (1996). "The epidemiology of Mycobacterium leprae: recent insight." FEMS Microbiol Lett **136**(3): 221-230.

- Vora, R. V. and A. Pilani (2014). "Epidermotropism of lepra bacilli in a patient with histoid Hansen's disease." Indian Dermatol Online J **5**(4): 504-507.
- Walker, S. L. and D. N. Lockwood (2008). "Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management." Lepr Rev **79**(4): 372-386.
- WHO (1998). Expert Committee on Leprosy. World Health Organ Tech Rep Ser. **874**: 1-43.
- WHO (2001). "'Guide to eliminate leprosy as a public health problem" (first edition, 2000, World Health Organization)." Int J Lepr Other Mycobact Dis **69**(1): 34-35.
- WHO (2013). "Global leprosy: update on the 2012 situation." Wkly Epidemiol Rec **88**(35): 365-379.
- WHO (2015). "Global leprosy update, 2014: need for early case detection". Wkly Epidemiol Rec. **90**: 461-474.
- WHO (2016). "Global Leprosy Strategy 2016-2020: accelerating towards a leprosy-free world". WHO Library Cataloguing-in-Publication. SEA-GLP-2016.2
- Winter, N., J. A. Triccas, B. Rivoire, M. C. Pessolani, K. Eiglmeier, E. M. Lim, S. W. Hunter, P. J. Brennan and W. J. Britton (1995). "Characterization of the gene encoding the immunodominant 35 kDa protein of Mycobacterium leprae." Mol Microbiol **16**(5): 865-876.
- Wren, B. W., R. A. Stabler, S. S. Das, P. D. Butcher, J. A. Mangan, J. D. Clarke, N. Casali, T. Parish and N. G. Stoker (1998). "Characterization of a haemolysin from Mycobacterium tuberculosis with homology to a virulence factor of Serpulina hyodysenteriae." Microbiology **144** (Pt 5): 1205-1211.
- Young, D. B. and T. M. Buchanan (1983). "A serological test for leprosy with a glycolipid specific for Mycobacterium leprae." Science **221**(4615): 1057-1059.
- Zhao, Z., X. W. Liu, J. Jia, L. Cai and J. Z. Zhang (2015). "Rapid Identification of Mycobacterium Leprae by Polymerase Chain Reaction-restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Heat Shock Protein 65 Gene from Skin Specimens." Chin Med J (Engl) **128**(21): 2964-2966.

35

ABSTRACT

36 The aim of the present study was to produce and validate the reactivity of a recombinant polypeptide formed using
37 epitopes from *Mycobacterium leprae* proteins with serum antibodies of leprosy patients. We used *in silico* tools to
38 evaluate structural and physicochemical parameters. These properties were then used construct a recombinant
39 polypeptide formed by epitopes of proteins from *M. leprae*. The design was adjusted in order to obtain proteins
40 that could provide the specificity and sensitivity necessary to diagnose leprosy. Several bioinformatics tools were
41 used to obtain information, such as major histocompatibility complexes I (MHC-I) and II (MHC-II) epitopes,
42 subcellular localization, signal peptide presence, primary, secondary, and tertiary structures, as well as to edit the
43 3D model. The result was a recombinant polypeptide composed of 15 epitopes of six different *M. leprae* proteins
44 (ML1358, ML2055, ML0885, ML1811, ML1812, and ML1214): rMLP15, which was expressed, purified and
45 evaluate in ELISA. Sera from 24 positive patients and 14 healthy controls were tested by ELISA using rMLP15
46 as antigen. ELISA-rMPL15 was able to recognize 79.17% of patients with leprosy with a sensitivity of 92.86%.
47 MLP15 was also able to recognize, in the same proportion, bacillary and non-bacillary patients, which is desirable
48 for an adequate leprosy diagnosis. In summary, our results indicate that this protein has utility for leprosy diagnosis
49 and the availability of such recombinant polypeptide will simplify future test development, thereby reducing
50 production costs.

51 **Key-words:** *M. leprae*, recombinant polypeptide, diagnosis, leprosy

52

54 Leprosy is chronic infectious disease, caused by *Mycobacterium leprae*, an intracellular alcohol-acid
55 bacillus (Araújo 2003). If not detected early and adequately treated, *M. leprae* causes dermatological and
56 neurological granulomatous lesions on the skin, which is responsible for incapacitation at various levels (Porto et
57 al. 2015). Although the number of people with leprosy has drastically decreased globally, the disease is still
58 endemic in many countries. Brazil ranks second highest in the number of new cases of leprosy (22,940 in 2017
59 alone) in the world (Vieira et al. 2018). As a result, the World Health Organization (WHO) has outlined several
60 objectives to achieve zero transmission of the leprosy cases, which it aims to meet between 2016 and 2020. Of
61 these, the development of new diagnostic tools has been stressed to be of utmost importance (WHO 2016).

62 The diagnosis of leprosy is based mainly on clinical presentations, which is dependent on the signs and
63 symptoms presented by the patient (Richardus et al. 2017). Although there are serological tests available based on
64 *M. leprae* antigens, they are insufficient to detect all positive cases of the disease and are only used to aid clinical
65 diagnosis (Kim et al. 2013). Other diagnostic methods, such as bacilloscopy and histopathology, can be used, but
66 these too lack adequate sensitivity and are still dependent on well-trained technicians (Cheng et al. 2019).
67 Molecular techniques, such as PCR and qPCR, which has shown high levels of sensitivity may be used. However,
68 these techniques are still quite expensive and difficult to perform in the field (Martinez et al. 2014; Cheng et al.
69 2019).

70 Since the sequencing of *M. leprae* strains (Cole et al. 2001), several proteins and tests, based on proteins,
71 have been developed for the serological diagnosis of leprosy (Meeker et al. 1986; Duthie et al. 2007; Hungria et
72 al. 2017). Even though they have shown good results, these tests and proteins are only capable of detecting
73 lepromatous and symptomatic cases, but inefficient in detecting paucibacillary cases (Kumar et al. 2014; Duthie
74 et al. 2014a; Bahmanyar et al. 2016). Thus, the development of a reliable diagnostic test for leprosy is necessary
75 (Kumar et al. 2014). Specific epitopes of *M. leprae* proteins were used to construct a coding sequence for a
76 polypeptide capable of serologically recognizing patients with leprosy.

77 Thus, the goal of the present study was to produce and validate the reactivity of a recombinant polypeptide
78 formed by epitopes from different proteins of *M. leprae*, and potentially testing it against serum antibodies of
79 leprosy patients. We refined previous observations by determining antibody-reactive regions within select antigens
80 in order to produce a synthetic protein that combines these reactive portions within a single product. Our results
81 indicate that this protein has utility for leprosy diagnosis and the availability of such recombinant polypeptide will
82 simplify future test development, reducing production costs.

83 MATERIALS AND METHODS

84 Construction DNA sequence of recombinant polypeptide MLP15

85 DNA sequence of 15 epitopes of *M. leprae* (MLP15) from 6 different proteins (ML1358, ML2055,
86 ML0885, ML1811, ML1812, and ML1214) (Bobosha et al. 2012) were selected for the design of a single encoding
87 molecule of the polypeptide MLP15. Once the epitopes were selected, a linker of 3 glycine residues was introduced
88 between them. Vector-NTI Express v 1.1.1 program was used for designing the polypeptide MLP15 DNA and a
89 codon-optimized gene for *Escherichia coli* was ordered from Epoch Life Science (Houston, Texas, USA). After
90 the construction, the NCBI Blastp (Altschul et al. 1990) was used to identify homologous proteins in the genus
91 *Micobacterium* (taxid: 81858) and *Homo sapiens* (taxid: 9606).

92 *In silico analyses*

93 Physicochemical properties calculation of polypeptide was performed using ProtParam (Gasteiger et al.
94 2005) from ExPASy server that provided molecular weight, theoretical PI, amino acid composition, extinction
95 coefficient, estimated half-life, instability, and aliphatic indexes. For the provision of primary, secondary, tertiary
96 structure, and 3D model, were performed the synthesis with RaptorX (Källberg et al. 2012) and edited the
97 polypeptide with Discovery Studio Visualization -BIOVIA (2017).

98 Prediction of the subcellular location of the sequence was evaluated using three online software: PSORTb
99 3.0.2 (Yu et al. 2010), CELLO v.2.5 (Yu et al. 2004), and Gneg-mPLoc (Shen and Chou 2010), respectively.
100 Results considered to be more consistent, if they were equal in two software. Prediction of the presence and
101 location of signal peptides of cleavage were performed with SignalP 4.1 (Petersen et al. 2011), with prediction of
102 protective antigen done with VaxiJen 2.0 (Doytchinova and Flower 2007).

103 *Cloning, expression, and purification of polypeptide MLP15*

104 After synthesizing, DNA sequence encoding polypeptide MLP15 was cloned in pAE expression vector (Ramos et
105 al. 2004) between the enzymes sites *Bam*HI and *Hind*III. The plasmid pAE/MLP15 was used to transform BL21
106 Star™ (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A small-scale expression test was performed, and, after verifying
107 the expression, one colony was inoculated with 500 mL of Luria Bertani (LB) broth. The expression of rMLP15
108 was induced by addition of 1 M of Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO,
109 USA) for 3 h at 37 °C with agitation. Purification protocol was conducted in accordance with Simionatto et al.
110 (2010). Briefly, the colonies were sonicated followed by centrifugation. Next, the supernatant with the recombinant
111 protein was solubilized in wash buffer (20 mM tris-HCL, 8 M urea, 500 mM NaCl and 300 mM imidazole) at pH
112 8.0 (Simionatto et al. 2010). Purification of rMLPL15 was performed by affinity chromatography using His Trap™
113 (GE Healthcare, Madison, WI, USA) 1 mL columns precharged with Ni-Sepharose. The purity of the rMLP15
114 protein was determined by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and the
115 concentration was determined using a BCA Assay (Pierce, Rockford, IL, USA).

116 *Western blot with recombinant proteins*

117 Purified recombinant protein MLP15 was solubilized in a sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10%
118 glycerol, 5% 2-β-mercaptoethanol and 2% SDS) at pH 6.8 and separated by 12% SDS-PAGE. Proteins were
119 electroblotted onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Madison, WI, USA). The membrane was blocked
120 by incubation in 5% skim milk diluted in PBS-T (phosphate buffered saline plus tween) overnight at 4 °C. After
121 three washes with PBS-T, the membrane was incubated for 1 h at 37 °C with monoclonal antibody anti-6 × His
122 tag conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and diluted at 1:6,000 in PBS-T. After three
123 washes with PBS-T, the membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated mouse anti-
124 IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), diluted to 1:6,000 and incubated for 1 h at 37 °C. Reactive bands were
125 visualized using 3,3'-diaminobenzidine and H₂O₂.

126 STUDY POPULATION

127 Sera from 24 patients positive for leprosy in the clinical examination, 10 multibacillary (MB) and 14
128 paucibacillary (PB), were used in the ELISA evaluation. In addition, sera from 14 healthy individuals were used
129 as negative controls. These individuals were subjected to a clinical examination; they had no suspected leptotic

130 lesions and declared no information concerning contact with leprosy or tuberculosis patients. The blood samples
131 were collected by venipuncture and serum samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use. This study was approved by
132 Research Ethical Committee (1.816.093-11/09/2016) of the Federal University of Grande Dourados (UFGD). All
133 the participants signed an informed consent before enrolment.

134 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

135 The immunoreactivity of anti-rMLP15 IgG was performed according to a previously published protocol
136 by Lima *et al* (2017) with modifications. Briefly, polystyrene 96 well ELISA plates (Kasvi™) were coated with
137 16–18 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ with $1\text{ }\mu\text{g/well}$ of rMLP15 in $100\text{ }\mu\text{L}$ of 0.1 M sodium carbonate buffer at pH 9.6. After three
138 washes with 0.05% PBS-T, the plates were blocked with $200\text{ }\mu\text{L/well}$ of 5% skimmed milk in PBS-T for 2 h at 37
139 $^{\circ}\text{C}$. Thereafter, the plates were washed three times with PBS-T, followed by addition of $100\text{ }\mu\text{L/well}$ of patient's
140 serum (diluted 1:50 in 5% skimmed milk in 0.05% PBS-T). After 1 h of incubation at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ and three washes with
141 PBS-T, $100\text{ }\mu\text{L/well}$ of anti-human IgG peroxidase-conjugated antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
142 diluted 1: 10,000 in PBS-T, was added to the plates and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 hour. The reactions were developed
143 with tetramethylbenzidine solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ($100\text{ }\mu\text{L/well}$) for 15 min at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
144 Finally, the reaction was stopped with $100\text{ }\mu\text{L/well}$ of sulfuric acid 2 N . Absorbance was determined at 450 nm in
145 spectrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Mean values were calculated from sera samples assayed in
146 triplicate.

147 *Statistical analysis*

148 All data were analyzed by GraphPad Prism v.5.0 software (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). Statistical
149 variations were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), followed Dunn's test for multiple
150 comparisons. The ability of immunoglobulin levels to discriminate leprosy patients from health controls was
151 evaluated using the receiver operating characteristic (ROC) curves, and sensitivity and specificity were selected
152 based on Youden's index. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

153 **RESULTS**

154 *Construction of polypeptide MLP15 and in silico analysis*

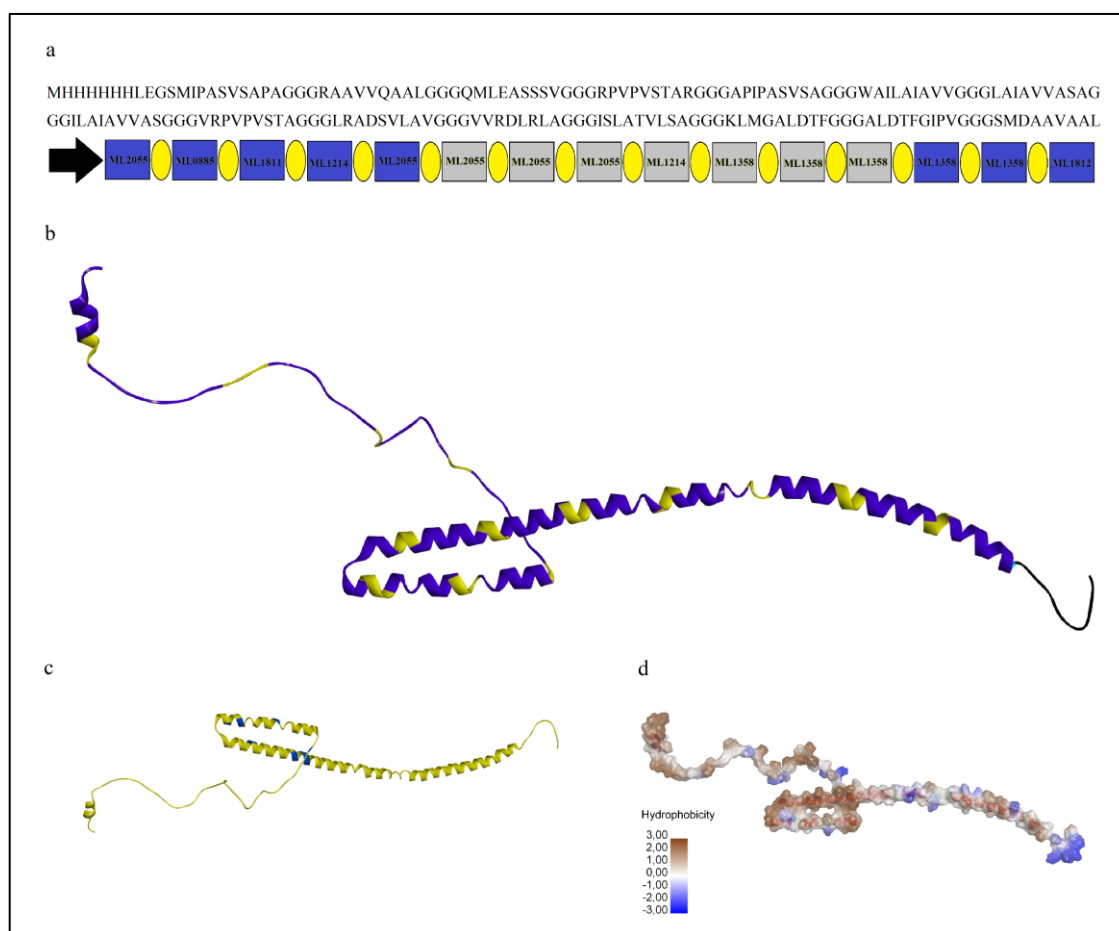
155 The result of the polypeptide MLP15 of the six proteins (ML1358, ML2055, ML0885, ML1811, ML1812,
156 ML1214) of *M. leprae* was a sequence of 569 bp that was translated into a 189 amino acid and with a molecular
157 weight of 17 kDa (Table 1 and Fig. 1a). The search for homologous proteins, using the complete MLP15 sequence
158 challenged with several interest genera, did not yield any result. Thus, this indicates to us that there will be no
159 cross-reaction with other pathogens of the genus *Mycobacterium*. Moreover, there was no homology with genera
160 of other animals that could interfere in future tests. Analysis by SignalP did not find peptide signals, indicating
161 that the polypeptide MLP15 could not be cleaved or inadequately expressed. The prediction made by the three
162 proposed software presented different predictions for the subcellular location of the polypeptide MLP15 (Table
163 1). The evaluation performed by VaxiJen showed positivity for the protective antigen, indicating that MLP15 has
164 antigenic potential and may also be an alternative in vaccine trials (Table 1). ProtParam demonstrated that
165 polypeptide MLP15 has high isoelectric potential (pI, 10.5) and high general mean of hydrophathy (GRAVY, 0.70)
166 (Table 1).

167

168 **Tab. 1** Physicochemical properties estimated through the ProtParam and prediction of subcellular localization,
 169 peptide signal and protective antigen of polypeptide MLP15

Physicochemical property	
Number of amino acids	189
Molecular weight (Da)	17,310
Theoretical pI	10.5
Total of negatively charged residues (Asp + Glu)	7
Total of positively charged residues (Arg + Lys)	9
Extinction coefficient	5,500
Abs. 0,1% (=1g/l)	0.318
Grand average of hydropathicity	0.709
Subcellular Localization (Psortb)	Cytoplasmic Membrane
Subcellular Localization (Cello)	Extracellular
Subcellular Localization (Gneg-mPLoc)	Cytoplasm
Peptide Signal (SignalP)	No
Prediction of protective antigen (VaxiJen)	Probable Antigen

170 The results of the secondary and tertiary structure analysis showed that epitopes and glycine linkers of
 171 polypeptide MLP15 (Fig. 1a and 1b) performed structural extension and linearization with most of the amino
 172 acids exposed (Fig. 1c). In addition, it showed that MLP15 had an essentially hydrophobic surface (Fig. 1d).

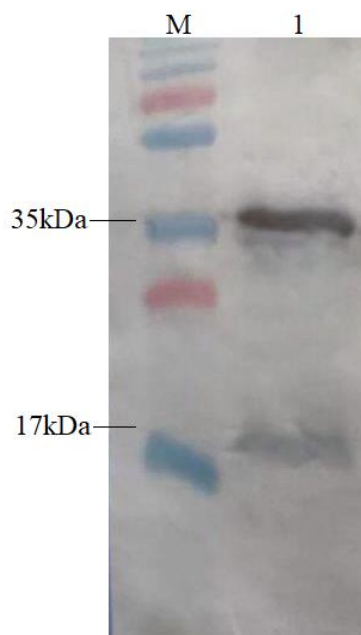


173
 174 **Fig. 1** 3D rendering of the MLP15. **a** Primary and secondary structure of MLP15. *black arrow*: poly-his-tag
 175 sequence, restriction enzymes sites, and start codon; *blue*: MHC-II epitopes; *grey*: MHC-I epitopes; and *yellow*:
 176 3-glycine Linker. **b** Prediction of tertiary structure of polypeptide MLP15. *blue*: epitopes; and *yellow*: 3-Gly
 177 Linker. **c** Exposed surface of MLP15. *yellow*: exposed amino acids; and *blue*: buried amino acids. **d** Hydrophobic

178 surface of polypeptide MLP15 with color representation. *brown*: more hydrophobic; *blue*: more hydrophilic;
179 *white*: neutral. The analyses were done by RaptorX and edited in Discovery Studio Visualization-Biovia

180 *Cloning, expression and purification*

181 Polypeptide MLP15 DNA sequence was cloned in the pAE expression vector and confirmed by restriction
182 enzyme digestion, PCR, and sequencing. The highest level of MLP15 expression was obtained by *Escherichia coli*
183 BL21 RP strain (Fig. 2). The yields obtained after purification were approximately 2.2 mg/L. After the
184 purification, the presence of homodimers with approximately 35 kDa and 17 kDa (the predictable size of the
185 rMPL15) were observed in western blot, using the anti-6 His tag (Fig. 2).

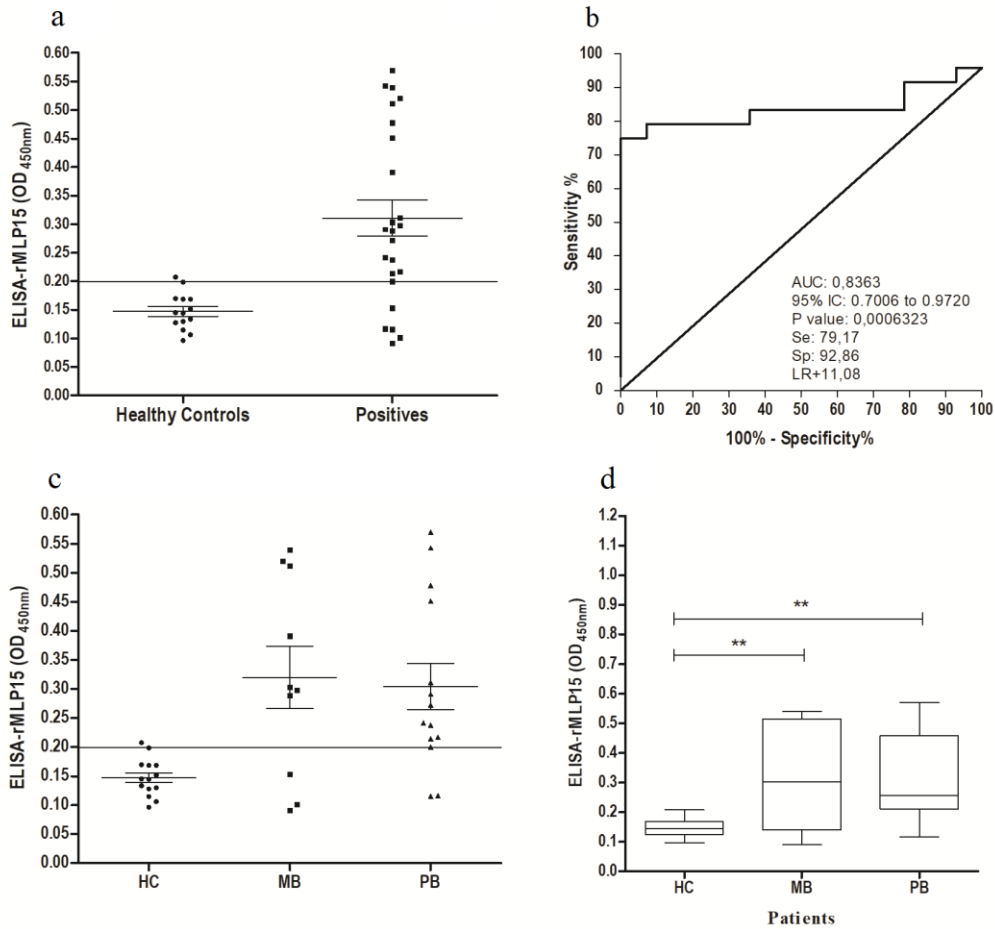


186

187 **Fig. 2** Western Blot of purified rMPL15 showing reaction with bands of approximately 17 and 35 kDa. The protein
188 was recognized by monoclonal antibody anti-6 His tag. *M* PageRuler Ladder (Thermo Scientific) and *1* purified
189 His-rMPL15

190 *ELISA-rMPL15*

191 The rMPL15 was able to recognize 19 of the 24 positive sera evaluated in ELISA (Fig. 3a), with a
192 specificity of 92.86%, sensibility of 79.17%, and with an area under the ROC curve (AUC) of 0.83 (Fig. 3b).
193 Stratifying within the positive MB and PB patients, the ELISA-rMPL15 recognized 7/10 (70%) of the patient's
194 MB and 12/14 (87%) of PB (Fig. 3c) fragments. The results of the statistical analyses did not show any significant
195 difference between the MB and PB groups, but both were significantly different from the health patients group
196 (Fig. 3d). All analyses demonstrated significant differences ($p < 0.001$) between patients with leprosy and control
197 patients according to the ROC analysis. Sensitivity and specificity were selected based on Youden's index (Fig.
198 3).



199

200 **Fig. 3** Results from indirect ELISA-MLP15 of patients' sera. **a** ELISA-MLP15 in sera from 24 leprosy patients
 201 and 14 healthy controls (HC). **b** Receiver Operating Characteristic (ROC) curve used to distinguish between
 202 positive and healthy controls (HC). **c** Anti-MLP15 levels IgG stratified paucibacillary patients (PB) and
 203 multibacillary patients (MB). **d** Levels of IgG anti-MLP15 comparing HC (14) and MB (10) and PB (14) patients;
 204 serum levels were analyzed by ANOVA, followed by post-hoc using Dunn's test. ** $p < 0,001$. *AUC* area under the
 205 curve, *CI* Confidence interval, *Se* sensitivity, *Sp* specificity, *LR* likelihood ratio, *PB* paucibacillary, and *MB*
 206 multibacillary

207

DISCUSSION

208

209 The use of sequences and tools of genomic analysis was a milestone in molecular biology and allowed a
 210 range of studies with these sequences (Heather and Chain 2015). In this context, research to find specific antigens
 211 for diagnosis has been improved with the genome sequences, using a more rational approach in the search of tools
 212 to be used in the diagnosis of many infection diseases (Nagai et al. 2009). This study used a new approach in the
 213 design of protein for the serological detection of patients with leprosy. Here, we proposed a recombinant protein
 214 constituted by the union of 15 epitopes of six different proteins of *M. leprae*, designated rMLP15, which was used
 in an indirect ELISA of sera from leprosy-positive patients and healthy controls.

215

216 During the design of the MLP15, several bioinformatics analyzes were carried out with the purpose of
 217 guiding the process and rationalizing parameters that could help us make changes to better express and purify
 218 MLP15. Some characteristics of MLP15 are conducive for its use in diagnosis For instance, its extended chain
 structure, with many exposed peptides, increases the possibility of recognition by specific immunoglobulins

219 (Bergamaschi et al. 2019). The success of the MLP15 tertiary structure is due to the methodology used for its
220 design, with the union of exclusive linear epitopes separated by 3-glycine linkers, which increases flexibility
221 between protein-protein interactions. In our case, the epitope-epitope interactions would have helped the various
222 epitopes stabilize without interfering with each other, thereby avoiding undesirable interactions between them
223 (Reddy Chichili et al. 2013). The exclusive use of linear epitopes is justified by the fact that the heterologous
224 expression of whole proteins in *E. coli* is not able to mimic the glycosylation process of the natural expression of
225 *Mycobacterium* species, rendering obsolete the existing conformational epitopes, which may become non-specific
226 for the antibodies (Barlow et al. 1986; Duthie et al. 2010; Duthie et al. 2014b; Bahmanyar et al. 2016; Bergamaschi
227 et al. 2019). In the same context, the fact that conformational epitopes were not included in the construction does
228 not seem to be limiting for the serological tests against sera from leprosy positive patients.

229 Although the potential of MLP15 in detecting individuals with leprosy and the advantages of the rational
230 antigen selection approach has been demonstrated, we also identified the formation of dimers in the expression of
231 rMLP15. This could be explained by the high isoelectric potential (pI) of MLP15 (10.5) found. Indeed, such pH
232 could modify the arrangement of the hydrophobic bridges and hydrophilic properties of the protein, in a process
233 similar to the formation of the so-called amyloid fibrils occurring as denaturants, wherein a protein chain binds to
234 other sheet-forming structure. This is much akin to α -Helix, forming homo and dimer-type coils (Kyte and
235 Doolittle 1982; Francis et al. 2012).

236 In addition, to the exclusive use of linear epitopes, we have also included in the construction of MLP15,
237 MHC-I and MHC-II epitopes of different *M. leprae* proteins. For this, we take into account that there may be two
238 different responses with different *M. leprae* host outcomes. Paucibacillary individuals (PB) have a predominant
239 CD8 + T cell response with MHC-I involvement, resulting in a form of leprosy in which there is little presence of
240 bacilli and lesions. This, thus, makes the diagnosis both clinically and serologically more complex. On the other
241 hand, most existing tests have the capacity to detect multibacillary (MB) individuals. These individuals have a
242 CD4 + T cell response with involvement of MHC-II, making the ensuing leprosy more aggressive, with a higher
243 number of lesions and bacillary disease (Men et al. 1999; Spierings et al. 2001; Blackwell et al. 2009; Chakraborty
244 et al. 2010).

245 We believe that this approach of rational selection of protein epitopes that could comprehensively
246 encompass the peculiarities of leprosy and increase the capacity of detection of the constructed protein was crucial
247 for the result obtained. The rMLP15 was able to detect, in a proportional way with good sensitivity and specificity,
248 both MB patients and PB patients. This is, indeed, superior to rapid commercial tests that show highly variable
249 sensitivity between MB and PB individuals. MLP15 detected approximately 85% (12/14) with a specificity of
250 92%, giving us a good reliability to the test, despite our small sample size. The detection capabilities found in
251 previous studies, using different proteins like NDO-LID and PGL-I, was 34 and 35% in PB individuals. Higher
252 results have been reported in MB individuals, with detection rates of 73 and 81%, respectively (Leturiondo et al.
253 2019). MLP15 also exceeds the detection rate of the LID-I and PGL-I / NDO-BSA antigens in ELISA test, both
254 detecting 20% of PB patients (Duthie et al. 2007).

255 This result indicates that, perhaps, we can overcome the difficulty in detecting PB individuals. Although
256 there were clear limitations in our study, especially regarding the small sample size, the need for testing in patients
257 with other relevant infections was well demonstrated. This result could broaden the horizons in the search for
258 diagnostic tools and makes the targeting approach more thorough than just expression of whole proteins.

259 Furthermore, despite having a large number of epitopes, including both MHC-I and MHC-II, as well as
260 conformational and linear epitopes, they are not always specific or capable of being recognized by
261 immunoglobulins. Importantly, by using separately selected epitopes, our study offers a rationally and promising
262 approach in the search of more efficient tools for the diagnosis, not only of leprosy, but also of several other
263 diseases (Duthie et al. 2010).

264 **CONCLUSION**

265 MLP15 polypeptide demonstrated positive results for the detection of immunoglobulins against *M.*
266 *leprae*, in both multibacillary and paucibacillary patients. Our data indicate that the methodology used in the design
267 MLP15 was valid and could help in the search for new diagnostic tools for leprosy.

268 **FUNDING INFORMATION**

269 Support Foundation for the Development of Education, Science and Technology in the State of Mato
270 Grosso do Sul (FUNDECT grants 092/2015).

271 **ACKNOWLEDGEMENTS**

272 We would like to thank the Center of Technological Development, Biotechnology (CDTEC) of the
273 Federal University of Pelotas (UFPel) that has given us the expression strains.

274 **CONFLICTS OF INTEREST**

275 The authors have no conflicts of interest to declare.

276 **REFERENCES**

- 277 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*
278 215:403–410 . doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- 279 Araújo MG (2003) [Leprosy in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:373–82
- 280 Bahmanyar ER, Smith WC, Brennan P, Cummings R, Duthie M, Richardus JH, Saunderson P, Shwe T, Rosen S,
281 Geluk A (2016) Leprosy diagnostic test development as a prerequisite towards elimination: requirements from the
282 user’s perspective. *PLoS Negl Trop Dis* 10:e0004331
- 283 Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM (1986) Continuous and discontinuous protein antigenic determinants.
284 *Nature* 322:747–748
- 285 Bergamaschi G, Fassi E, Romanato A, D’Annessa I, Odinolfi MT, Brambilla D, Damin F, Chiari M, Gori A,
286 Colombo G (2019) Computational Analysis of Dengue Virus Envelope Protein (E) Reveals an Epitope with
287 Flavivirus Immunodiagnostic Potential in Peptide Microarrays. *Int J Mol Sci* 20:1921
- 288 Blackwell JM, Jamieson SE, Burgner D (2009) HLA and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 22:370–85,
289 Table of Contents
- 290 Bobosha K, Tang ST, van der Ploeg-van Schip J, Bekele Y, Martins MV, Lund O, Franken KL, Khadge S, Pontes
291 MA de A, Gonçalves H de S (2012) Mycobacterium leprae virulence-associated peptides are indicators of exposure
292 to *M. leprae* in Brazil, Ethiopia and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:112–123
- 293 Chakraborty S, Chakravorty R, Ahmed M, Rahman A, Waise TM, Hassan F, Rahman M, Shamsuzzaman S (2010)
294 A computational approach for identification of epitopes in dengue virus envelope protein: a step towards designing
295 a universal dengue vaccine targeting endemic regions. *In Silico Biol* 10:235–246
- 296 Cheng X, Sun L, Zhao Q, Mi Z, Yu G, Wang Z, Sun Y, Wang C, Man C, Fu F, Liu H, Zhang F (2019) Development
297 and evaluation of a droplet digital PCR assay for the diagnosis of paucibacillary leprosy in skin biopsy specimens.
298 *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007284 . doi: 10.1371/journal.pntd.0007284
- 299 Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris
300 D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T,

- 301 Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail
302 MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares
303 S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG (2001) Massive gene decay in the leprosy
304 bacillus. *Nature* 409:1007–11
- 305 Doytchinova IA, Flower DR (2007) VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and
306 subunit vaccines. *BMC Bioinformatics* 8:4 . doi: 10.1186/1471-2105-8-4
- 307 Duthie MS, Balagon MF, Maghanoy A, Orcullo FM, Cang M, Dias RF, Collovati M, Reed SG (2014a) Rapid
308 Quantitative Serological Test for Detection of Infection with *Mycobacterium leprae*, the Causative Agent of
309 Leprosy. *J Clin Microbiol* 52:613–619 . doi: 10.1128/JCM.02085-13
- 310 Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LPV, Martelli CMT, Stefani MMA, Nakatani M, de Jesus
311 RC, Netto EM, Balagon MVF, Tan E, Gelber RH, Maeda Y, Makino M, Hoft D, Reed SG (2007) Use of Protein
312 Antigens for Early Serological Diagnosis of Leprosy. *Clin Vaccine Immunol CVI* 14:1400–1408 . doi:
313 10.1128/CVI.00299-07
- 314 Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath R, Ito L, Oyafuso LKM, Manini MIP, Balagon MV, Tan
315 EV, Saunderson PR, Reed SG, Carter D (2010) Rational Design and Evaluation of a Multiepitope Chimeric Fusion
316 Protein with the Potential for Leprosy Diagnosis. *Clin Vaccine Immunol CVI* 17:298–303 . doi:
317 10.1128/CVI.00400-09
- 318 Duthie MS, Raychaudhuri R, Tutterrow YL, Misquith A, Bowman J, Casey A, Balagon MF, Maghanoy A, Beltran-
319 Alzate JC, Romero-Alzate M, Cardona-Castro N, Reed SG (2014b) A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy
320 based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. *Diagn Microbiol*
321 *Infect Dis* 79:233–239 . doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.02.006
- 322 Francis VG, Majeed MA, Gummadi SN (2012) Recovery of functionally active recombinant human phospholipid
323 scramblase 1 from inclusion bodies using N-lauroyl sarcosine. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39:1041–1048
- 324 Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification
325 and analysis tools on the ExPASy server. Springer
- 326 Heather JM, Chain B (2015) The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*
- 327 Hungria EM, Bühner-Sékula S, de Oliveira RM, Aderaldo LC, Pontes A de A, Cruz R, Gonçalves H de S, Penna
328 MLF, Penna GO, Stefani MM de A (2017) Leprosy reactions: The predictive value of *Mycobacterium leprae*-
329 specific serology evaluated in a Brazilian cohort of leprosy patients (U-MDT/CT-BR). *PLoS Negl Trop Dis* 11: .
330 doi: 10.1371/journal.pntd.0005396
- 331 Källberg M, Wang H, Wang S, Peng J, Wang Z, Lu H, Xu J (2012) Template-based protein structure modeling
332 using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7:1511–1522
- 333 Kim HJ, Prithviraj K, Groathouse N, Brennan PJ, Spencer JS (2013) Gene Expression Profile and Immunological
334 Evaluation of Unique Hypothetical Unknown Proteins of *Mycobacterium leprae* by Using Quantitative Real-Time
335 PCR. *Clin Vaccine Immunol CVI* 20:181–190 . doi: 10.1128/CVI.00419-12
- 336 Kumar A, Parkash O, Girdhar BK (2014) Analysis of antigens of *Mycobacterium leprae* by interaction to sera IgG,
337 IgM, and IgA response to improve diagnosis of leprosy. *Biomed Res Int* 2014:283278
- 338 Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*
339 157:105–132 . doi: 10.1016/0022-2836(82)90515-0
- 340 Leturiondo AL, Noronha AB, do Nascimento MOO, Ferreira C de O, Rodrigues F da C, Moraes MO, Talhari C
341 (2019) Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in
342 Brazil. *BMC Infect Dis* 19: . doi: 10.1186/s12879-018-3653-0
- 343 Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S (2014) PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the
344 Laboratory to the Clinic. *PLoS Negl Trop Dis* 8: . doi: 10.1371/journal.pntd.0002655
- 345 Meeker HC, Levis WR, Sersen E, Schuller-Levis G, Brennan PJ, Buchanan TM (1986) ELISA detection of IgM
346 antibodies against phenolic glycolipid-I in the management of leprosy: a comparison between laboratories. *Int J*
347 *Lepr* 54:530–539
- 348 Men Y, Audran R, Thomasin C, Eberl G, Demotz S, Merkle HP, Gander B, Corradin G (1999) MHC class I- and
349 class II-restricted processing and presentation of microencapsulated antigens. *Vaccine* 17:1047–1056

- 350 Nagai H, Nukaga Y, Saeki K, Akabayashi A (2009) Self-regulation of recombinant DNA technology in Japan in
351 the 1970s. *Hist Sci Tokyo* 19:1–18
- 352 Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from
353 transmembrane regions. *Nat Methods* 8:785–786
- 354 Porto AC, Figueira RB, Barreto JA, Lauris JR (2015) Evaluation of the social, clinical and laboratorial profile of
355 patients diagnosed with leprosy in a reference center in São Paulo. *Bras Dermatol* 90:169–77
- 356 Ramos CRR, Abreu P a. E, Nascimento ALTO, Ho PL (2004) A high-copy T7 Escherichia coli expression vector
357 for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol*
358 *Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol* 37:1103–1109 . doi: /S0100-879X2004000800001
- 359 Reddy Chichili VP, Kumar V, Sivaraman J (2013) Linkers in the structural biology of protein–protein interactions.
360 *Protein Sci Publ Protein Soc* 22:153–167 . doi: 10.1002/pro.2206
- 361 Richardus RA, van der Zwet K, van Hooij A, Wilson L, Oskam L, Faber R, van den Eeden SJF, Pahan D, Alam
362 K, Richardus JH, Geluk A (2017) Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients
363 in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis* 11: . doi: 10.1371/journal.pntd.0006083
- 364 Shen H-B, Chou K-C (2010) Gneg-mPLoc: a top-down strategy to enhance the quality of predicting subcellular
365 localization of Gram-negative bacterial proteins. *J Theor Biol* 264:326–333 . doi: 10.1016/j.jtbi.2010.01.018
- 366 Simionatto S, Marchioro SB, Galli V, Hartwig DD, Carlessi RM, Munari FM, Laurino JP, Conceição FR,
367 Dellagostin OA (2010) Cloning and purification of recombinant proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae*
368 expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 69:132–136
- 369 Spierings E, de Boer T, Wieles B, Adams LB, Marani E, Ottenhoff TH (2001) *Mycobacterium leprae*-specific,
370 HLA class II-restricted killing of human Schwann cells by CD4+ Th1 cells: a novel immunopathogenic mechanism
371 of nerve damage in leprosy. *J Immunol* 166:5883–8
- 372 Vieira MCA, Nery JS, Paixão ES, Freitas de Andrade KV, Oliveira Penna G, Teixeira MG (2018) Leprosy in
373 children under 15 years of age in Brazil: A systematic review of the literature. *PLoS Negl Trop Dis* 12: . doi:
374 10.1371/journal.pntd.0006788
- 375 WHO (2016) Global Leprosy Strategy 2016-2020: Accelerating towards a leprosy-free world
- 376 Yu C-S, Lin C-J, Hwang J-K (2004) Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by
377 support vector machines based on n-peptide compositions. *Protein Sci Publ Protein Soc* 13:1402–1406 . doi:
378 10.1110/ps.03479604
- 379 Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL
380 (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories
381 and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26:1608–1615. doi: 10.1093/bioinformatics/btq249