

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

BRUNELA PITANGA RAMOS MADUREIRA

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I EM PACIENTES INFECTADOS
PELO HIV EM ÁREA ENDÊMICA PARA HANSENÍASE**

**VITÓRIA
2015**

BRUNELA PITANGA RAMOS MADUREIRA

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI-PGL-I EM PACIENTES INFECTADOS
PELO HIV EM ÁREA ENDÊMICA PARA HANSENÍASE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doença Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Infecciosas.

Orientadora: **Profa. Dra. Patricia D. Deps**

VITÓRIA

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

M178p Madureira, Brunela Pitanga Ramos, 1976-
Pesquisa de anticorpos anti-PGL-I em pacientes infectados
pelo HIV em área endêmica para hanseníase / Brunela Pitanga
Ramos Madureira – 2015.
116 f. : il.

Orientador: Patricia Duarte Deps.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) – Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Coinfecção . 2. Hanseníase. 3.HIV. 4. Mycobacterium
leprae. I. Deps, Patricia Duarte. II. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
TESE DE DOUTORADO

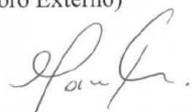
A doutoranda BRUNELA PITANGA RAMOS MADUREIRA apresentou a tese intitulada **“Pesquisa de Anticorpos Anti-pgl-i em Pacientes Infectados Pelo HIV em Área Endêmica para Hanseníase”** em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

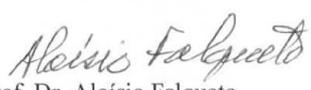
Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora decidiu (X) **aprovar** () **reprovar** a tese para habilitar a mestre em Doenças Infecciosas BRUNELA PITANGA RAMOS MADUREIRA, a obter o Grau de DOUTORA EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 26 de fevereiro de 2015


Prof. Dr. João Marcelo Azevedo de Paula Antunes
(Membro Externo)


Prof. Dr. David Jamil Hadad
(Membro Externo)


Prof. Dr. Moises Palaci
(Membro Interno)


Prof. Dr. Aloísio Falqueto
(Membro Interno)


Prof. Dra. Patricia Duarte Deps
(Orientadora)

Dedico este trabalho ao meu marido, Claudio Madureira, pelo apoio e incentivo nesses 19 anos; às minhas filhas, Maria Luisa e Ana Maria, por tornarem a minha vida mais alegre e tranquila; à minha mãe, Rita Pitanga, às minhas irmãs, Isabela e Mariela, e à Maria, pelo incentivo e pelo suporte nos cuidados com minhas filhas nos momentos que tive que me ausentar para me dedicar a minha pesquisa.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora, por tudo, sempre.

Aos pacientes que participaram do estudo.

À Pós Graduação em Doenças Infecciosas, assim como a todos os professores, alunos e funcionários.

Ao Núcleo de Doenças Infecciosas, pela estrutura e colegas que contribuíram para a execução do projeto, em especial a Carla Barone, por me auxiliar com os dados dos pacientes e a Fátima Aparecida Pereira, por todo apoio.

Ao Professor Rodrigo Rodrigues, pelo fornecimento dos testes “HIV Rapid Check”.

Aos Professores do Doutorado, em especial ao professor Moises Palaci, pelo apoio e aprendizado.

À minha orientadora, Professora Patrícia Deps, a quem devo grande parte da minha formação acadêmica, pelo incentivo e estímulo durante o desenvolvimento da Tese.

Aos Professores que compuseram da minha Banca de Qualificação, Professores Fausto Edmundo Pereira, Aloísio Falqueto e Norma Suely Oliveira, pelas críticas e sugestões que possibilitaram o aperfeiçoamento do meu trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM, em especial ao Fernando José e à Ivone.

Ao Programa de DST/AIDS, em especial à sua coordenadora, Sandra Fagundes.

Ao Laboratório de Microbiologia Celular da Fundação Oswaldo Cruz, em especial à pesquisadora Maria Cristina Vidal Pessolani, que gentilmente permitiu que toda a parte laboratorial da minha tese fosse feita no laboratório, e à doutoranda Fernanda Marques de Carvalho, por fazer passo a passo comigo a técnica ELISA anti-PGL-I e por sua generosidade em compartilhar seus conhecimentos em imunologia, que foram fundamentais para a conclusão da minha Tese.

Ao Programa Estadual de Hanseníase, pela disponibilização dos dados epidemiológicos da doença.

Aos colegas médicos infectologistas e dermatologistas do HUCAM.

Aos monitores e funcionários do Ambulatório de Pesquisa em Dermatologia, pela ajuda no atendimento aos pacientes e nas coletas de dados.

RESUMO

Esse estudo investiga a infecção subclínica de *Mycobacterium leprae* em pacientes infectados e não infectados pelo HIV, através da dosagem de anticorpos anti-PGL-I, e avalia se existe uma possível correlação dos resultados sorológicos encontrados com o estado de imunossupressão dos pacientes infectados pelo HIV. Foi realizado um estudo transversal analítico em 350 pacientes infectados pelo HIV e em 350 pacientes não infectados pelo HIV para detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I em região endêmica para hanseníase. Avaliou-se uma possível correlação do estado de imunossupressão dos pacientes infectados pelo HIV (contagem de linfócitos CD4+, carga viral e uso ou não de terapia antirretroviral) com a soropositividade para PGL-I. Dentre os pacientes infectados pelo HIV, 6% (21/350) apresentaram sorologia positiva para PGL-I e dos indivíduos não infectados pelo HIV, 29,1% (102/350) tinham PGL-I positivo. O grupo controle apresentou cerca de cinco vezes mais indivíduos com anticorpos anti-PGL-I do que o grupo infectado pelo HIV. Não houve diferença estatisticamente significativa na correlação do estado de imunossupressão do paciente com o resultado da sorologia anti-PGL-I. Houve uma menor produção de anticorpos anti-PGL-I em indivíduos infectados pelo HIV, o que pode indicar uma baixa taxa de infecção subclínica por *M. leprae*, ou uma baixa produtividade específica desses anticorpos, ou ambas as hipóteses. A desregulação de linfócitos B em indivíduos infectados pelo HIV pode ser a causa da baixa produção de anticorpos anti-PGL-I. Não houve correlação do estado de imunossupressão do paciente com o resultado da sorologia anti-PGL-I.

Palavras-chave: hanseníase – HIV – coinfeção - infecção subclínica – anti-PGL-I - *Mycobacterium leprae*

ABSTRACT

The present study investigated subclinical *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus (HIV) infected or uninfected individuals by measuring antibodies against *M. leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I). It also sought to establish whether the serology results correlated with the HIV-infected participants' state of immunosuppression. This was a cross-sectional study that analysed the anti-PGL-I immunoglobulin M antibody levels in 350 HIV-infected and 350 non-HIV-infected individuals residing in an area endemic for the two investigated conditions. The possible correlation between the state of immunosuppression of the HIV-infected participants (CD4+ cell count, viral load and the use or not of antiretroviral therapy) and anti-PGL-I seropositivity was assessed. Approximately 6% (21/350) of the HIV-infected and 29.1% (102/350) of the non-HIV-infected participants were anti-PGL-I antibody seropositive. The number of anti-PGL-I antibody seropositive individuals was approximately five-fold higher in the non-HIV-infected group, compared with the HIV-infected group. There was no significant correlation between the state of immunosuppression of the HIV-infected participants and the anti-PGL-I serology results. The HIV-infected individuals exhibited less anti-PGL-I antibody production relative to the control group, which may indicate a lower rate of subclinical *M. leprae* infection and/or lower specific production of this antibody. B cell dysregulation might cause the low anti-PGL-I antibody production in HIV-infected individuals. The patients' state of immunosuppression did not correlate with the anti-PGL-I serology results.

Keywords: Leprosy – HIV – coinfection–subclinical infection – anti-PGL-I - *Mycobacterium leprae*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos de prevalência de HIV nos pacientes com hanseníase.....	35
Tabela 2 - Estudos populacionais de prevalência de infecção subclínica de hanseníase utilizando a sorologia anti-PGL-I.....	50
Tabela 3 - Ponto de corte para positividade de sorologia anti-PGL-I.....	60
Tabela 4 - Resultado da sorologia anti-PGL-I nos grupos infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV.....	62
Tabela 5 - Pareamento dos grupos infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV.....	63
Tabela 6 - Perfil epidemiológico e estado imunológico dos pacientes infectados pelo HIV.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da D.O. nos grupos infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV.....	63
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – “*Acquired Immunodeficiency Syndrome*” (síndrome da imunodeficiência adquirida)

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guerin

BSA – albumina sérica bovina

CCRS – receptores de quimiocina tipo 5

CD4 – cluster de diferenciação 4

CD8 – cluster de diferenciação 8

CD68 – cluster de diferenciação 68

cel/mm³ – células por milímetro cúbico

D-BSA – dissacarídeo albumina sérica bovina

DNA – ácido desoxirribonucleico

DST – doenças sexualmente transmissíveis

ELISA – “*Enzyme-linked immunosorbent assay*” (Ensaio imunoenzimático)

ENH – eritema nodoso hansênico

EPF – Exame Parasitológico de Fezes

EDTA – “*Ethylenediamine tetraacetic acid*” (ácido etilenodiaminotetracético)

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

HAART – “*Highly Active Antiretroviral Therapy*” (terapia anti-retroviral)

hab - habitantes

HIV – “*human immunodeficiency vírus*” (vírus da imunodeficiência humana)

HIV-1 – Vírus da imunodeficiência humana subtipo 1

HLA-DR – antígeno de histocompatibilidade

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

IFN – interferon

IFN- α – interferon α

IFN- β – interferon β

IFN- γ – interferon γ

Ig - imunoglobulina

IgA – imunoglobulina A

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IL - interleucina

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

IL-10 – interleucina 10

IL-15 – interleucina 15

IL-1 β - interleucina 1 β

LAM - lipoarabinomanana

M. leprae – *Mycobacterium leprae*

MAC - *Mycobacterium avium intracellulare*

MB – Multibaciliar

μ g - micrograma

mg/ml – miligrama por mililitro

ml – mililitro

ML-ICA – ensaio imunocromatográfico para *M. leprae*

ML Dipstick – *Mycobacterium leprae*

ML Flow – teste do fluxo lateral de *M. leprae*

MNT – Micobactéria não causadora de tuberculose

M-O-BSA – monossacarídeo octil-BSA

nº - número

ND - natural dissacarídeo

ND-O BSA - natural dissacarídeo octil BSA

ND-O BSA - natural dissacarídeo octil BSA

NT - natural trissacarídeo

NT-O BSA - natural trissacarídeo octil BSA

NT-P BSA - natural trissacarídeo fenil BSA

nm – nanômetro

O - octila

OD – “*optical density*” (densidade óptica)

OMS - Organização Mundial da Saúde

P – fenólico

PCR – “*polymerase chain reaction*” (reação em cadeia de polimerase)

PGL - glicolípídeo fenólico

PGL-I – glicolípídeo fenólico 1

PB - Paucibacilar

PBS-tween – tampão fosfato salino tween

PBS/T – tampão fosfato salino tween

pH – potencial hidrogeniônico

PQT - Poliquimioterapia

R1 – reação tipo 1

R2 – reação tipo 2

RNA – ácido ribonucleico

SESA/ES – Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SPSS 9.0 – “*Statistical Package of Social Sciences*” versão 9.0 para Windows 2000

SRI - Síndrome de Reconstituição Imunológica

RNA – ácido ribonucleico

TARV - Terapia Antiretroviral

TB – tuberculose

TBS/T – salina tamponada com tris adicionado de 0,05% de Tween 20

Th- célula T auxiliar

Th1- célula T auxiliar tipo 1

Th2- célula T auxiliar tipo 2

TMB – tetrametilbenzidina

TNF – fator de necrose tumoral

TNF- α – fator de necrose tumoral α

$\mu\text{l/ml}$ – micrograma por mililitro

$\mu\text{l/poço}$ – micrograma por poço

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
2.1 HANSENÍASE.....	26
2.1.1 Agentes etiológicos e transmissão.....	26
2.1.2 Imunologia.....	27
2.1.3 Epidemiologia.....	29
2.2 HIV/AIDS.....	31
2.2.1 Agente etiológico e transmissão.....	31
2.2.2 Imunologia.....	31
2.2.3 Epidemiologia.....	33
2.3 COINFECÇÃO HIV-HANSENÍASE.....	34
2.3.1 Epidemiologia da coinfeção HIV-hanseníase.....	35
2.3.2 Manifestações clínicas da coinfeção HIV-hanseníase.....	35
2.3.3 Histopatologia da coinfeção HIV-Hanseníase.....	37
2.3.4 Hanseníase após a introdução da HAART em pacientes infectados pelo HIV.....	39
2.4 PGL-I.....	41

2.4.1 Estrutura e utilização do PGL-1.....	41
2.4.2 Estudos populacionais utilizando a sorologia anti PGL-1.....	45
2.4.3 Detecção de anticorpos anti PGL-I em pacientes HIV positivos.....	51
3 OBJETIVOS.....	52
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	53
4.2 POPULAÇÃO/CASUÍSTICA DO ESTUDO.....	53
4.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO.....	53
4.3.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV).....	53
4.3.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV).....	54
4.3.3 Terceira fase (pareamento).....	55
4.4 DINÂMICA DA COLETA DE DADOS.....	55
4.4.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV).....	55
4.4.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV).....	56
4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	56
4.5.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV).....	56
4.5.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV).....	57
4.5.3 Terceira fase (pareamento).....	57

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	57
4.6.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV).....	57
4.6.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV).....	57
4.6.3 Terceira fase (pareamento).....	58
4.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS.....	58
4.7.1 Coleta e armazenamento das amostras.....	58
4.7.2 Técnica de ELISA com antígeno PGL-I.....	58
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4.9 ASPECTOS ÉTICOS.....	61
4.10 CRONOGRAMA DAS ATIVIDADES DO ESTUDO EM OITO SEMESTRES.....	61
5 RESULTADOS.....	62
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	70
8 REFERÊNCIAS.....	71
9 ANEXOS.....	93

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por micobactérias apresentaram um aumento desde o início da epidemia do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Essa constatação, conjugada à circunstância de os linfócitos T CD4+ serem o principal alvo do vírus HIV, conduziram à expectativa de que pacientes coinfetados por HIV e *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) apresentassem a forma virchowiana da hanseníase, ou que passassem rapidamente da forma tuberculóide para a virchowiana, com a evolução da infecção pelo HIV (SAMPAIO et al., 1995; NAAFS, 2000; USTIANOWSKI et al., 2006). Entretanto, essa tendência não foi observada na maioria dos estudos que investigaram a coinfeção HIV-hanseníase, mesmo naqueles realizados em áreas endêmicas para ambas as infecções (PONNIGHAUS et al., 1991; SEKAR et al., 1994; ANDRADE et al., 1997; LIENHARDT et al., 1996; MACHADO et al., 1998; NAAFS, 2004; USTIANOWSKI et al., 2006; DEPS et al., 2008).

A transmissão da hanseníase é um tema ainda polêmico e pouco esclarecido dentro da sua história natural. De todo modo, é consenso que o maior risco de contágio é a convivência domiciliar com o doente bacilífero não tratado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Daí a importância de se identificar precocemente indivíduos infectados pelo *M. leprae*.

Em 1980, Brennan e Barrow identificaram o PGL-I (glicolípido fenólico I), que é um glicolípido muito abundante encontrado unicamente no *M. leprae*, e no ano seguinte esclareceram sua estrutura, sugerindo que a síntese química da última parte di e trissacarídeo providenciaria um epítipo antigênico que seria específico suficientemente para ser aplicado na sorologia para hanseníase (BUHRER-

SÉKULA, 2000). Desde então buscam-se testes que sejam capazes de diagnosticar a infecção por *M. leprae* e que possam ser usados em áreas endêmicas para identificar grupos de risco para monitoramento e medidas preventivas ou profiláticas.

A detecção de anticorpos anti-PGL-I é útil para identificar uma infecção presente ou passada pelo *M. leprae* (MOURA et al., 2008), um risco maior de desenvolver a hanseníase e também a disseminação do bacilo em áreas endêmicas (BUHRER-SÉKULA et al., 2003; DOUGLAS et al., 2004; GOULART; GOULART, 2008; MOURA et al., 2008), estando também essa positividade sorológica ao PGL-I relacionada à carga bacilar do indivíduo (BUHRER-SÉKULA et al., 2000). Uma avaliação do título de anticorpos anti-PGL-I entre os contatos de pacientes diagnosticados com hanseníase permite identificar os indivíduos positivos que possam ter um maior risco de desenvolver a doença, o que possibilita um melhor acompanhamento e redução do nível de transmissão (SPENCER; BRENNAN, 2011).

Devido ao fato da infecção pelo HIV afetar diretamente os linfócitos T que expressam receptores CD4+ e sua progressão resultar em depleção progressiva dessas células imunes, ocorre uma diminuição na habilidade do organismo para combater doenças oportunistas, entre elas a tuberculose (GODFREY-FAUSSETT et al., 2002; WILLIAMS; DYE, 2003; REID et al., 2006). Estudos demonstram que entre os pacientes soropositivos para HIV e portadores de infecção latente por *Mycobacterium tuberculosis* o risco de adoecimento aumenta 20 vezes em relação aos soronegativos para HIV (SELWYN et al., 1989; ANTONUCCI et al., 1995). Um maior risco de adoecimento ou a manifestação das formas mais graves da hanseníase seria esperado considerando-se as semelhanças biológicas entre esses microorganismos. Essa hipótese aparentemente foi comprovada em modelo animal, através de estudos feitos com macacos *rhesus* infectados simultaneamente pelo *M.*

leprae e pelo SIV (vírus da imunodeficiência dos símios), que desenvolveram a forma virchowiana da doença (GORMUS et al., 1989; GORMUS et al., 1994, GORMUS et al., 1998; BASKIN et al., 1990). Por outro lado, não se observou um maior risco de adoecimento ou de manifestação das formas mais graves da doença em estudos realizados em seres humanos infectados pelo HIV (POENNIGHAUS et al., 1991; SEKAR et al., 1994; ANDRADE et al., 1997; LIENHARDT et al., 1996; MACHADO et al., 1998; NAAFS, 2000; USTIANOWSKI et al., 2006; DEPS et al., 2008).

Para se avaliar a infecção pelo *M. leprae*, ao contrário da tuberculose latente, em que se dispõe de teste tuberculínico cutâneo e Quantiferon TB GOLD (DOCKRELL et al., 2011), a única ferramenta imunológica efetiva é o teste sorológico para detecção de anticorpos anti-PGL-I (CHO et al., 2001; OSKEM et al., 2003; MARTINS et al., 2010; DUTHIE et al., 2011; LOBATO et al., 2011). Uma avaliação da sorologia PGL-I entre contatos de pacientes diagnosticados com hanseníase permite a identificação de indivíduos positivos que podem ter um maior risco de desenvolver a doença, permitindo uma melhor monitorização, redução da transmissão e também pode ser um indicador da magnitude da doença em uma área selecionada (BUHRER-SEKULA, 2008; BAGSHAWE et al., 1990; BAUMGART et al., 1993; PONNIGHAUS et al., 1994; MOET et al., 2006; SINAN, 2007; SPENCER; BRENNAN, 2011; BARRETO et al., 2012).

Muito embora muitos estudos de soroprevalência de anticorpos anti-PGL-I tenham sido realizados em países endêmicos e não endêmicos (FINE et al., 1988; CARTEL et al., 1990; GROENEN et al., 1990; DOUGLAS et al., 1992; CELLONA et al., 1993; VAN BEERS et al., 1994; GONZALEZ-ABREU et al., 1996; VAN BEERS et al., 1999; BRASIL et al., 1998; BAKKER et al., 2004; BAKKER et al., 2006; BUHRER-SÉKULA

et al., 2008; SILVA et al., 2008; FROTA et al., 2010; BARRETO et al., 2011; BARRETO et al., 2012; STEFANI et al., 2012; HUNGRIA et al., 2012), esse tipo de análise não foi feita em indivíduos infectados pelo HIV, ou seja, nesses pacientes a coinfeção HIV-hanseníase nunca foi devidamente estimada. Os estudos publicados apenas verificaram a soroprevalência do HIV entre hansenianos, sendo que alguns deles fizeram a comparação da soroprevalência do HIV em um grupo com hanseníase (grupo caso) e um grupo sem hanseníase (grupo controle) (USTIANOWSKI et al., 2006). Esses estudos mostraram uma grande variação na taxa de infecção por HIV entre os pacientes com hanseníase (0,3-33%) e a maioria não encontrou uma diferença estatisticamente significativa na soroprevalência do HIV entre os grupos com hanseníase e a população da área estudada (Tabela 1) (LEONARD et al., 1990; TEKLE-HAIMANOT et al., 1991; FROMMEL et al., 1994; SEKAR et al., 1994; KAWUMA et al., 1994; LINHEARDT et al., 1996; ANDRADE et al., 1997; MACHADO et al., 1998; GEBRE et al., 2000; HUSSAIN et al., 2000; MOSES et al., 2003; HUSSAIN et al., 2005; DEPS et al., 2008). Contudo, os resultados desses trabalhos devem ser analisados com cautela, por apresentarem diferentes desenhos de estudo e critérios de inclusão distintos, e também por empregarem metodologias que não foram suficientemente detalhadas nas respectivas publicações.

Uma alternativa oposta a esse caminho foi o estudo realizado por Gonzalez-Abreu et al. em Cuba, em 1993, que verificou a soroprevalência de *M. leprae* em indivíduos infectados pelo HIV. Esse trabalho demonstrou uma maior porcentagem de soropositividade anti-PGL-I em indivíduos HIV-positivos quando comparada ao grupo não infectado pelo HIV.

Em 2003, o Dr. Ben Naafs liderou um estudo com o mesmo propósito, na Tanzânia, cujos resultados, entretanto, não foram publicados. Esse trabalho foi mencionado em outro estudo publicado por Naafs em 2004 (NAAFS, 2004). Em razão disso, mantivemos comunicação pessoal com Naafs, que nos forneceu o resumo do trabalho. Pelo que pudemos apurar, os pesquisadores realizaram o teste ELISA para detectar a produção de anticorpos anti-PGL-I, como forma de avaliar a ocorrência de infecção subclínica pelo *M. leprae* em um grupo de pacientes com AIDS e em outro grupo de indivíduos não infectados pelo HIV. Diferentemente dos resultados obtidos por Gonzales-Abreu et al., Naafs e seus colaboradores encontraram uma taxa de sororreatividade anti-PGL-I muito menor nos pacientes com AIDS do que nos controles saudáveis.

Diante da divergência entre os resultados desses dois estudos, propomo-nos a investigar se a infecção subclínica pelo *M. leprae* é realmente maior em pacientes infectados pelo HIV (conforme apuraram Gonzales-Abreu et al.) e se existe uma possível associação dos resultados sorológicos encontrados com o estado de imunossupressão dos pacientes (contagem de linfócitos CD4+, carga viral e uso ou não de HAART).

O estudo foi realizado no Estado do Espírito Santo, que é classificado como endêmico para hanseníase e também apresenta incidência relevante de infecção pelo HIV (SESA/ES, 2012a; SESA/ES, 2012b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HANSENÍASE

2.1.1 Agentes etiológicos e transmissão

A primeira descrição da presença de um bacilo em lesão de doentes com hanseníase data de 1873, feita por Gerhard Armauer Hansen. Foi a primeira sugestão de que uma doença humana estaria ligada à presença de um agente etiológico de natureza infecciosa, determinando o início da era do pensamento científico em relação à identificação de agentes causais, à existência de transmissão e contágio e à prevenção e tratamento das doenças (SKINSNES, 1973).

O *M. leprae* permaneceu como um enigma devido à impossibilidade de ser cultivado *in vitro*. Porém, em 2001 Cole et al. concluíram a sequência completa do seu genoma (GOULART et al., 2002)

O *M. leprae* é um parasita intracelular de baixa virulência e de multiplicação lenta (DRAPPER, 1986).

Estima-se que 70% a 90% da população seja resistente ao *M. leprae*, devido à imunidade inata, que poderia estar reforçada pela vacinação com BCG ou por reação cruzada em pessoas que têm contato com o *M. tuberculosis* ou outras micobactérias não tuberculosas (TALHARI; NEVES, 1997)

Em 2008, foi identificada no México uma nova espécie de micobactéria não tuberculosa, denominada *M. lepromatosis*, responsável pela hanseníase virchowiana difusa (HAN et al., 2008). Posteriormente, além do isolamento desse microorganismo no México, o mesmo foi detectado em Cingapura (HAN et al., 2012), Canadá (JESSAMINE et al., 2012), Brasil (HAN et al., 2014) e Birmânia (HAN et al., 2014).

A transmissão da hanseníase é um tema ainda polêmico e pouco esclarecido dentro da sua história natural. A maioria dos autores concorda que a principal forma de contágio da hanseníase é a inter-humana, transmitida pelas vias aéreas superiores, por disseminação de aerossol de secreções nasais (NOORDEEN, 1994). O DNA de *M. leprae* também pode ser encontrado em *swabs* nasais em até 5% de indivíduos sadios em áreas endêmicas (HATTA, 1995; RAMAPRASAD, 1997). Além disso, evidências da existência do bacilo na camada córnea da pele de pacientes multibacilares não tratados fazem aumentar a possibilidade da transmissão transepidérmica (RAMAPRASAD et al., 1997; JOB et al, 2008). A fonte mais importante do *M. leprae* são os pacientes da forma multibacilar, que não receberam tratamento com poliquimioterapia (TALHARI; NEVES, 1997). Os pacientes das formas paucibacilares têm recebido menos atenção como possíveis fontes de *M. leprae*, mas foram apropriadamente considerados em várias publicações (CELLONA et al, 1993; HALDER et al, 2001). É consenso que o maior risco de contágio é a convivência domiciliar, com o doente bacilífero não tratado, ou seja, quanto mais íntimo e prolongado o contato maior será a possibilidade de adquirir a infecção (NOORDEEN, 1993).

Na literatura também são encontrados relatos de casos de hanseníase por contágio acidental com agulhas contaminadas (MARCHOUX, 1934; KLINGMÜLLER, 1938),

por material utilizado para fazer tatuagem (PORRITT; OLSEN, 1948), contágio após mordedura de cão (GUPTA et al., 1984) e após vacinação com BCG (STORNER et al., 1981). O *M. leprae* foi encontrado, ainda, na placenta (BRYCESON, 1992) e no leite materno (PEDLEY, 1967), porém a transmissão transplacentária ou por ingestão de leite materno são desconhecidas.

Após o contágio inicial, a hanseníase pode se desenvolver dentro de um período de 3 meses a 40 anos (REES; MCDOUGALL, 1977). Em média, as lesões da hanseníase desenvolvem-se após um período de incubação de 2 a 5 anos, dependendo da resposta imune do hospedeiro (BRYCESON, 1992).

A maior parte da população onde a hanseníase é endêmica é resistente ao *M. leprae*, devido à imunidade inata. A vacinação com o BCG, recebida no primeiro ano de vida, oferece uma quantidade variável de proteção contra a hanseníase, como ocorre na tuberculose (FINE; SMITH, 1996). Acredita-se, ainda, que certa proteção contra o *M. leprae* pode advir do estímulo imunológico ocasionado pelo contato com *M. tuberculosis* ou com micobactérias não tuberculosas, através de reação cruzada (TALHARI; NEVES, 1997).

2.1.2 Imunologia

A magnitude das respostas imunes celular e humoral é responsável pela proteção do indivíduo nas infecções por micobactérias (KAUFMANN, 1993). Os linfócitos Th1 e Th2 CD4+ ditam, através das suas citocinas, a ativação dos macrófagos, levando às diferentes formas clínicas da hanseníase. Portanto, o espectro clínico da hanseníase está intimamente ligado à resposta imune. Nos pacientes com a forma

tuberculóide existe uma forte resposta Th1, com surgimento de lesões localizadas, bem delimitadas, com alteração das sensibilidades térmica e dolorosa, e com destruição de fibras nervosas em áreas específicas, baixa carga bacilar e ativação do macrófago pelas células Th1.

Na ausência de uma resposta Th1, o bacilo não encontra resistência e se dissemina, levando ao quadro da hanseníase virchowiana. Nesse caso a doença é generalizada, com alta carga bacilar (presenças de muitos bacilos no interior dos macrófagos e escassez de linfócitos na lesão) e ativação dos linfócitos Th2 que induzem a produção de altos níveis de anticorpos. Nas formas dimorfas, ocorre um padrão clínico e imunológico de resposta intermediária (KAUFMANN, 1993).

2.1.3 Epidemiologia

O Brasil está entre os países que não conseguiram alcançar a meta de eliminação da hanseníase proposta pela Organização Mundial de Saúde. Em 2012, o número de casos novos no país foi de 33.303 e seu coeficiente de prevalência foi de 1,51 casos por 10.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a). Além disso, ocupamos o segundo lugar em número de casos registrados, estando atrás apenas da Índia (WHO, 2013a).

O Espírito Santo é o estado mais endêmico da região sudeste do Brasil. Em 2012 apresentou coeficiente geral de detecção de hanseníase de 21,88 casos por 100.000 habitantes, enquanto o Rio de Janeiro (9,3/100.000), São Paulo (3,89/100.000) e Minas Gerais (7,37/100.000) apresentaram valores bem inferiores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

O coeficiente de prevalência no Espírito Santo em 2013 foi de 2,01 casos por 10.000 habitantes, que, segundo parâmetros do Ministério da Saúde, classifica-se como de média endemicidade. Os parâmetros de endemicidade utilizados para o coeficiente de prevalência são: < 1 , baixo; $1 \leq 5$, médio; $5 \leq 10$, alto; $10 \leq 20$, muito alto; > 20 , hiperendêmico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

Se considerarmos o coeficiente de detecção geral de hanseníase como parâmetro de endemicidade, em 2013 o Espírito Santo foi classificado como área de alta endemicidade (19,43/100.000 habitantes) (SESA/ES, 2013a). Os parâmetros de endemicidade utilizados para o coeficiente de detecção da hanseníase recomendados pelo Ministério da Saúde são: $< 0,20$, baixo; $0,20 \leq 10$, médio; $10 \leq 20$, alto; $20 \leq 40$, muito alto; ≥ 40 , hiperendêmico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

Em 2013, deram entrada no registro ativo da Secretaria de Estado de Saúde do Estado do Espírito Santo 808 casos de hanseníase. Desses, 746 (92,3%) eram casos novos, 28 (3,5%) recidivas e 34 (4,2%) outros tipos de entrada (SESA/ES, 2013a).

Portanto, o estado do Espírito Santo ainda apresenta coeficientes de detecção da hanseníase considerados de alta endemicidade, com focos de hiperendemicidade, embora já apresentando tendência de queda (SESA/ES, 2013a).

2.2 HIV/AIDS

2.2.1 Agente etiológico e transmissão

A AIDS é uma doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) subtipos 1 e 2, sendo que o subtipo 1 é o mais frequente. O HIV é um vírus de RNA que possui uma enzima, a transcriptase reversa, que permite a sua incorporação ao DNA das células do sistema imune, como os linfócitos T (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A transmissão do HIV pode ser horizontal, quando é realizada através das relações sexuais, pela inoculação de sangue e hemoderivados; ou vertical, quando é realizada durante a gestação ou amamentação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

2.2.2 Imunologia

O principal dano causado pelo HIV é a deterioração progressiva do sistema imune celular, que conduz a imunodepressão grave e torna o indivíduo mais susceptível a infecções oportunistas.

O HIV infecta predominantemente as células T CD4+, e a destruição dessas células pode ocorrer pelo efeito citopático do vírus. Além disso, ocorre um aumento da apoptose dessas células, que, por expressarem antígenos virais no nível da membrana, também podem ser destruídas por citotoxicidade mediada pela célula T CD8+, fenômeno que também contribui para a redução das células T CD4+. Sendo a célula T CD4+ uma das mais importantes na cooperação da resposta imune, a

diminuição numérica e a alteração de sua função levam a uma supressão da resposta imunológica. Essa supressão está associada com a diminuição de IL-2, IFN- γ e TNF- α (IMAMI et al, 1999; MACHADO et al., 2004).

O resultado disso é que, durante o curso da infecção pelo HIV a reatividade imunológica, que está relacionada com a resposta imune celular, vai lentamente se deteriorando. Sendo a célula T CD4+ uma das mais importantes na ativação da resposta imune, a diminuição numérica e a alteração de sua função levam a uma supressão da resposta imunológica. Essa supressão está associada predominantemente com a diminuição de IL-2, IFN- γ e TNF- α (IMAMI et al, 1999).

O HIV provoca várias alterações entre as citocinas produzidas durante a infecção pelo HIV, logo após a primeira detecção sistêmica do vírus (KEATING et al., 2012). Nessa complexa rede de citocinas, o equilíbrio entre supressores virais, tais como IFN- α , IFN- β e IL-10, IL-6, IL-15, IL-1 β e TNF- α podem contribuir para o equilíbrio da replicação viral, sendo determinante para o prognóstico de AIDS. Os pacientes infectados pelo HIV têm maior produção de TNF- α em comparação com os soronegativos. O TNF- α é uma potente citocina inflamatória, assim como as IL-1 β e IL-6, sendo que o TNF- α e a IL-6 têm efeitos sinérgicos (HAN et al., 1996). Portanto, o aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias e inflamatórias contribui para a replicação viral e muitas manifestações de imunodeficiência (MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1997). Outras citocinas produzidas, como a IL-2, a IL-4 e o IFN- γ , podem aumentar a replicação viral, devido à sua função ativadora de células infectadas pelo HIV (MACHADO et al., 2004).

2.2.3 Epidemiologia

Desde o início da epidemia, quase 78 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV e quase 39 milhões morreram em decorrência do HIV. Atualmente existem 35 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS e maioria delas vive nos países da África sub-Saariana, Ásia e América do Sul (WHO, 2013b).

Estima-se que aproximadamente 734.000 pessoas vivem com HIV/AIDS no Brasil no ano de 2014, o que corresponde a uma prevalência de 0,4% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A taxa de detecção de AIDS no Brasil tem apresentado estabilização nos últimos dez anos, com uma média de 20,5 casos por 100 mil habitantes e um total 39.501 casos em 2013 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Segundo dados publicados pela Secretaria de Saúde do Espírito Santo, a taxa de incidência no estado em 2011 foi de 14,5 casos por 100.000 habitantes (SESA/ES, 2013b). Foram notificados no Espírito Santo 8.505 casos de AIDS entre o início de 1985 e dezembro de 2011. Em relação ao HIV, a estimativa é de que existam 17.000 pessoas infectadas no estado (SESA/ES, 2008).

Assim, apesar de apresentar uma tendência à estabilização da incidência da doença, o Espírito Santo ainda mantém (em dados de 2013) uma incidência relevante de AIDS com taxa de detecção de 19,8 casos por 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

2.3 COINFECÇÃO HIV-HANSENÍASE

O HIV alterou a epidemiologia das doenças micobacterianas (LAGRANGE, 1995; PORTER, 1996), e tem levado a um aumento da gravidade da infecção em numerosas doenças micobacterianas (KLEIN et al., 1998), como aquelas causadas pelo complexo do *Mycobacterium avium* no mundo industrializado (HORSBURGH et al., 1985), bem como pela tuberculose na África abaixo do Sahara (PORTER, 1996).

Devido ao fato dos linfócitos T CD4+ serem o principal alvo do vírus HIV, esperava-se que pacientes coinfectados por HIV e *M. leprae* apresentassem a forma virchowiana da hanseníase, ou que passassem rapidamente da forma tuberculóide para a virchowiana, com a evolução da infecção pelo HIV. Entretanto, estudos demonstraram que esses pacientes não apresentaram alterações em sua evolução clínica, nem nas prevalências das duas doenças (PONNIGHAUS et al., 1991; SEKAR et al., 1994; ANDRADE et al., 1997; LIENHARDT et al., 1996; MACHADO et al., 1998; NAAFS, 2004; USTIANOWSKI et al., 2006; DEPS et al., 2008).

Contudo, após a introdução da terapia anti-retroviral (HAART), essa expectativa se modificou. Vários estudos sobre coinfecção descrevem a hanseníase manifestando-se como síndrome de reconstituição imune (LANDAY et al., 2002; LAWN et al., 2003; VISCO-COMANDINI et al., 2004; COUPPIE et al., 2004; TRINDADE et al., 2005; KHARKAR et al., 2007; MARTINIUK et al., 2007; TRINDADE et al., 2006; BATISTA et al., 2008; DEPS et al., 2008; MENEZES et al., 2009; TALHARI et al., 2010; DEPS et al., 2013), com relatos de aumento da prevalência de hanseníase nos pacientes infectados pelo HIV (COUPPIE et al., 2009; VINAY et al., 2009; TALHARI et al., 2010).

2.3.1 Epidemiologia da coinfeccção HIV-hanseníase

Os estudos de coinfeccção de hanseníase e HIV revelaram, em sua maioria, que não houve diferença estatisticamente significativa na prevalência de hanseníase entre os grupos infectados pelo HIV (caso) e não infectados pelo HIV (controle) (Tabela 1).

Os estudos mostram grande variação nos resultados de infecção pelo HIV entre os pacientes com hanseníase (0,12 - 33%); conforme se verifica na tabela abaixo:

Tabela 1 – Estudos de prevalência de HIV nos pacientes com hanseníase.

Autor	Ano	País	N. de pacientes com hanseníase dentre os HIV +	Prevalência de HIV entre os hansenianos
Andrade <i>et al.</i>	1997	Brasil	3/1016	0,3%
Machado; David	1998		13/234	5,3%
Deps <i>et al.</i>	2008		3/162	1,8%
Borgdorff <i>et al.</i>	1993	Tanzânia	9/93	9,7%
van Der Broek <i>et al.</i>	1997		83/697	11,9%
Tekle-Haimanot	1991	Etiópiã	8/250	3,2%
Frommel <i>et al.</i>	1994		31/644	4,8%
Gebre <i>et al.</i>	2000		22/581	3,8%
Kawuma <i>et al.</i>	1994	Uganda	23/189	12,2%
Leonard <i>et al.</i>	1990	Congo, Cote dlvoire, Senegal e lêmen	43/1245	3,5%
Lienhardt <i>et al.</i>	1996	Mali	11/740	1,5%
Meeram <i>et al.</i>	1989	Zâmbia	6/18	33,3%
Moses <i>et al.</i>	2003	Nigéria	11/105	10,5%
Ponnighaus <i>et al.</i>	1991	Malawi	2/112	1,8%
Sekar <i>et al.</i>	1994	Índia	4/1019	0,5%
Hussain <i>et al.</i>	2000		5/4025	0,12%
Hussain <i>et al.</i>	2005		5/2125	0,38%
Orege <i>et al.</i>	1993	Kênia	20/129	15,5%

2.3.2 Manifestações clínicas da coinfeccção HIV-hanseníase

A hanseníase tem uma classificação espectral com a existência de várias sub-formas clínicas entre as duas formas polares da doença. Essas formas polares são a virchowiana, com anergia para antígenos do *M. leprae*, e a tuberculóide, com boa resposta imune celular frente ao *M. leprae*. As formas intermediárias são a dimorfa-

tuberculóide, a dimorfa-dimorfa e a dimorfa-virchowiana, que apresentam alguma resposta imune mediada por células e muitas vezes são imunologicamente instáveis. Todas as formas clínicas de hanseníase foram descritas na coinfeção (LUCAS, 1993; NAAFS, 2000).

Inicialmente a previsão era de que hanseníase virchowiana seria a forma clínica mais comum de hanseníase em pacientes coinfectados (GORMUS, 1994; BASKIN et al., 1990), já que a infecção pelo HIV destrói lentamente a resposta imune mediada por células e o *M. leprae* pode, por isso, pelo menos teoricamente, multiplicar-se sem resistência (NAAFS, 2000). No entanto, desde a introdução da Terapia Antiretroviral (HAART), a forma dimorfa-tuberculóide vem predominando, como demonstrado no estudo realizado por Sarno et al., em 2008, no Brasil. Isso indica que algum tipo de resposta imunológica positiva está ocorrendo em pacientes com hanseníase.

Tanto a hanseníase quanto o HIV têm efeitos sobre a resposta do sistema imune. Em pacientes infectados com o HIV essa resposta está enfraquecida, com células T de memória (CD4+ CCR5+) destruídas, e há também uma rápida mudança de células T CD4+, resultando em redução em seu número (BATTEGAY et al., 2006).

Na hanseníase, ocorre uma ativação dos macrófagos infectados pelo *M. leprae* pela resposta imune celular. A hanseníase também é complicada por surgimento episódios de instabilidade imunológica, que são as reações hansênicas. Estas podem ser do tipo 1, causadas por hipersensibilidade retardada à antígenos do *M. leprae*, bem como do tipo 2, caracterizada por formação depósitos de imuno-complexo (LUCAS, 1993; LOCKWOOD et al., 2008). Os coinfectados com reação

tipo 1 e portadores da hanseníase da forma clínica dimorfa-tuberculóide têm um maior risco de dano neural (NERY et al., 2002; DEPS et al., 2013).

2.3.3 Histopatologia da coinfeção HIV-Hanseníase

Em 2013, Deps et al. descreveram um estudo histológico detalhado em coinfectados demonstrando um predomínio de lesões dimorfas-tuberculóides, que apresentaram formação de granuloma compacto e resposta imune celular competente envolvendo macrófagos ativos e linfócitos T CD4+ e CD8+. Foram realizados exames clínico e histológico de 11 pacientes com coinfeção e 31 com apenas hanseníase. Características histopatológicas e imunohistoquímicas das lesões da hanseníase, como presença de edema, formação de granuloma, necrose, maior quantidade de células CD68+, neurites e expressão de HLA-DR foram mais evidentes nas biópsias dos coinfectados. Não foi vista qualquer evidência histológica que pudesse sugerir que a infecção pelo HIV bloqueasse a resposta imunológica em pacientes com hanseníase. Os autores relataram, ainda, que pacientes coinfectados com hanseníase e HIV produzem uma resposta imune com lesões granulomatosas típicas da hanseníase; que pacientes dimorfos-tuberculóides tem uma alta ativação imune demonstrada pela formação na derme de granuloma compacto, edema e processo inflamatório da epiderme. Além disso, foi encontrada nos coinfectados uma alta taxa de reação hansênica do tipo 1, que demonstra recuperação da resposta imune. A contagem de linfócitos T CD4+ não pareceu estar relacionada com as alterações histológicas (DEPS et al., 2013).

Em trabalho anterior, publicado no ano de 2000, Nery et al. fizeram exame histopatológico de lesões de pele em 12 pacientes coinfectados antes do início da

TARV e verificaram que as lesões tinham uma morfologia celular indistinguível da dos doentes sem infecção pelo HIV, mesmo nos casos em que se verificou uma contagem muito baixa de linfócitos T CD4+ (NERY et al., 2000). Em sentido contrário, Sarno et al. relataram, em estudo publicado em 2008, que com o início da TARV ocorreu alteração do aspecto das lesões de pele.

Nesse mesmo sentido se manifestaram Deps et al. no trabalho referido anteriormente, publicado em 2013, quando disseram acreditar na hipótese de que com o início da TARV poderia haver alteração tanto do aspecto clínico e quanto do histopatológico das lesões, levando-os mais para o pólo tuberculóide, aumentando o número de células CD4+ e aumentando a ativação de macrófagos e a formação de granulomas (DEPS et al., 2013).

Relato semelhante é encontrado em estudo precedente publicado por Sampaio et al. no ano de 1995, que descreveram que os exames histopatológicos de lesões de pacientes dimorfos-tuberculóides coinfectados apresentam granulomas bem formados contendo número normal de linfócitos T CD4+, contrastando com os granulomas encontrados em outras micobacterioses como a tuberculose (SAMPAIO et al., 1995). Nesse estudo, os autores notaram a expressão do HLA-DR por células dérmicas adjacentes ao granuloma, evidenciando a produção local de IFN- γ . Além disso, a ausência de bactérias comprova a grande eficácia da imunidade local. Apesar da coinfeção não interferir nos espectros tuberculóide e virchowiano da hanseníase, observam-se nesses pacientes casos mais graves de neurite e maior incidência de reações reversas (SAMPAIO et al., 1995).

Ustianowski et al. também relataram que, apesar da baixa contagem de linfócitos T CD4+ no sangue periférico, os pacientes coinfetados pelo HIV possuem resposta imunológica preservada ao bacilo no sítio da doença (USTIANOWSKI et al., 2006).

2.3.4 Hanseníase após a introdução da HAART em pacientes infectados pelo HIV

O objetivo da HAART é a reconstituição imune, porém em algumas situações observa-se um quadro clínico de caráter inflamatório exacerbado, chamado de Síndrome Inflamatória associada à Reconstituição Imune (IRIS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b).

Segundo o Ministério da Saúde, a IRIS pode se manifestar como:

- piora “paradoxal” de doenças infecciosas preexistentes, geralmente autolimitadas, mas que podem assumir formas graves;
- agravamento de uma doença já diagnosticada;
- aparecimento de uma doença não diagnosticada previamente, exacerbando uma doença subclínica preexistente.

Os critérios para a suspeita da IRIS são:

- piora de doença reconhecida ou surgimento de nova manifestação após início da HAART;
- presença de imunodepressão grave (contagem de LT-CD4+ < 100) antes do início ou modificação do esquema;

- relação temporal entre o início da HAART e o aparecimento das manifestações inflamatórias (dentro de 4 a 8 semanas do início da HAART);
- presença de resposta imune, virológica ou ambas após início da HAART;
- exclusão de falha terapêutica, reação adversa ou superinfecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b).

As descrições da hanseníase como síndrome da reconstituição imune começaram em 2000 (OPROMOLLA et al., 2000; PIGNATARO et al., 2000). A partir daí inúmeros estudos sobre o assunto foram publicados porém com um número pequeno de pacientes ou que se limitavam a relatos de caso (LANDAY et al., 2002; LAWN et al., 2003; VISCO-COMANDINI et al., 2004; COUPPIE et al., 2004; TRINDADE et al., 2005; KHARKAR et al., 2007; MARTINIUK et al., 2007; BATISTA et al., 2008; MENEZES et al., 2009; DEPS; LOCKWOOD, 2010; TALHARI et al., 2010; DEPS et al., 2013).

Em 2010, Deps e Lockwood revisaram os dados de 21 casos publicados de hanseníase manifestando-se como IRIS e relataram que 89,5% dos pacientes apresentavam o diagnóstico histopatológico de hanseníase tuberculóide ou dimorfa-tuberculóide. A evidência da restauração imune foi demonstrada com a contagem média de linfócitos T CD4 +, que antes do início da TARV foi de 91 células/ml, e que posteriormente, no momento do diagnóstico da hanseníase como IRIS, aumentou para 248 células/ml.

As principais conclusões extraídas dos estudos publicados sobre a hanseníase se manifestando como IRIS (ABEL et al., 2000; OPRMOLLA et al., 2000; PIGNATARO et al., 2000; LANDAY et al., 2002; LAWN et al., 2003; VISCO-

COMANDINI et al., 2004; NAAFS, 2004; COUPPIE et al., 2004; TRINDADE et al., 2005; USTIANOWSKY et al., 2006; KHARKAR et al., 2007; MARTINIUK et al., 2007; BATISTA et al., 2008; DEPS et al. 2008; MENEZES et al., 2009; TALHARI et al., 2010; MULLER et al., 2010; PAVIE et al., 2010; DEPS; LOCKWOOD, 2010; DEPS et al., 2013) são as seguintes:

- a forma clínica mais comum é a hanseníase tuberculóide; a maior parte dos casos aconteceu até 6 meses após a introdução da HAART;
- a neurite hansênica pode ser confundida com a neuropatia do HIV, ou com neuropatias relacionadas a medicamentos que compõem a HAART;
- alguns pacientes coinfectados apresentam lesões atípicas da hanseníase, como por exemplo presença de ulcerações; e
- frequentemente a hanseníase se manifesta como reação reversa hansênica

2.4 PGL-I

2.4.1 Estrutura e utilização do PGL-1

O PGL-I é um glicolípídeo muito abundante, encontrado exclusivamente no *M. leprae*, e é considerado seu principal glicolípídeo antigênico. Ele foi isolado e caracterizado em 1981, e sua estrutura foi esclarecida no ano seguinte (BRENNAN; BARROW, 1980; HUNTER; BRENNAN, 1981).

A molécula do PGL-I é composta pelo trissacarídeo 3,6-di-O-metil-beta-D-glucopiranosil-(1-4)-2,3-di-O-metil-alfa-L-ramnopiranosil-(1-2)-3-O-metil-alfa-L-ramnopiranosil (HUNTER et al., 1982). A remoção do açúcar terminal resultava em perda da ligação da maioria dos anticorpos, enquanto que a remoção da cadeia longa de ácidos graxos da molécula do PGL-I não produzia efeito na ligação dos anticorpos. Esses dados sugerem que a síntese química da última parte do dissacarídeo produz um epítipo que estimula a produção de anticorpos monoclonais, empregados na detecção do PGL-I (YOUNG et al., 1984). A síntese de açúcares (natural di- ou trissacarídeos, ND ou NT, respectivamente), seguida à identificação do açúcar terminal como o antígeno primário determinante do PGL-I e à sua ligação à albumina de soro bovino ("*bovine serum albumine*", BSA) com um anel octila (O), ou um anel fenólico (P), podem produzir antígenos semi-sintéticos (Fujiwara et al., 1984). O antígeno ND-O-BSA foi considerado igual ou melhor do que os outros derivados do antígeno PGL-I, tanto os naturais, quanto os sintéticos (FUJIWARA et al., 1984; WU et al., 1988; CHANTEAU et al., 1988).

Devido a natureza glicídica do PGL-I, este antígeno estimula a produção predominante de anticorpos da classe IgM (BRENNAN et al., 1980; CHO et al., 1983; LEVIS et al., 1986; BRETT et al., 1986; KOSTER et al., 1987), pois não consegue ativar uma célula CD4 de maneira suficiente para que ela interaja com um linfócito B de modo a que ocorra a maturação de afinidade e mudança de isotipo (CHO et al., 1983; LEVIS et al., 1986; KOSTER et al., 1987).

Estudos relatam que também há produção, embora em menor concentração, de outras classes de imunoglobulinas, como a IgG (CHO et al., 1988; STEFANI et al., 1998; KUMAR et al., 1998) e IgA (CREE et al., 1988; SAAD et al., 1991). Importante salientar que os anticorpos da classe IgM são específicos para o PGL-I, enquanto os

anticorpos da classe IgG anti-PGL-I podem apresentar reação cruzada com outros antígenos em pacientes com tuberculose, em pacientes com outras micobacterioses conhecidas (CHO et al., 1988; CHO et al., 1992; KUMAR et al., 1998), ou em pacientes com doenças hepáticas ou autoimunes (KUMAR et al., 1998). Investigações feitas para avaliar a produção de anticorpos contra o PGL-I em pacientes com hanseníase evidenciaram que a concentração média de IgG e IgM foi maior no pólo virchowiano que no grupo tuberculóide (BRETT et al., 1983) e que há predomínio de IgM em relação a IgG (CHO et al., 1983; LEVIS et al., 1986; KOSTER et al., 1987).

Um grande desafio nas pesquisas da hanseníase é a descoberta de testes que seriam capazes de diagnosticar a infecção por *M. leprae* e que possam ser usados em áreas endêmicas. Esse teste identificaria grupos de risco para monitoramento e medidas preventivas ou profiláticas (BRENNAN, 2000). Assim, há alguns anos vêm sendo desenvolvidos estudos com a finalidade de atingir esse objetivo, que empregam as mais diferentes técnicas (BRENNAN, 2000; MARTELLI et al., 2002).

Esses estudos serviram de base para a produção de antígenos sintéticos, em substituição ao PGL-I nativo, que é escasso e de difícil aquisição (EGGELTE et al., 1988).

O PGL-I é o antígeno mais usado e estudado na sorologia da hanseníase. O ensaio imunoenzimático tipo ELISA é um método em que detecta anticorpos anti-PGL-I em altos títulos, e pode auxiliar o diagnóstico de hanseníase (DISSANAYAKE et al., 1983; DOUGLAS et al., 1987). A resposta imune é dirigida preponderantemente contra o açúcar terminal, isto é, à última parte do dissacarídeo, que é o principal determinante antigênico do PGL-I (BRETT et al., 1986; FUJIWARA et al., 1987).

Outros antígenos imunodominantes do *M. leprae*, capazes de ativar clones específicos de linfócitos B, foram descritos (GROATHOUSE et al., 2006; REECE et al., 2006; ARAOZ et al., 2006; DUTHIE et al., 2007; CORSTJEANS et al., 2008; STEFANI, 2008). Porém, até o momento, o teste melhor padronizado e mais avaliado na hanseníase é com o PGL-I.

A sorologia anti-PGL-I pode ser realizada além do ensaio imunoenzimático (ELISA), através do teste de hemaglutinação passiva, hemaglutinação em partículas de gelatina, dipstick e teste de fluxo imunocromatográfico (ML Flow test®). Porém, os testes mais utilizados são o ELISA e o ML Flow. O ensaio imunoenzimático ELISA apresenta especificidade de 98% e sensibilidade de 80-100% nos pacientes multibacilares, tendo sensibilidade de apenas 14-40% nos pacientes paucibacilares (OSKAM et al., 2003). A sensibilidade do ML Flow é de 97,4% em pacientes MB, sua especificidade é de 90,2% e esse teste tem boa correlação com o ELISA (91%; $k=0,77$) (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003).

A hanseníase é uma doença infecciosa que apresenta um amplo espectro clínico e imunológico. As formas multibacilares geralmente apresentam uma deterioração da imunidade celular, muitos bacilos, alta carga antigênica e altos níveis séricos de anticorpos; já as formas paucibacilares geralmente apresentam os parâmetros de imunidade celular preservados, escassos bacilos e pouca ou nenhuma elevação dos níveis de anticorpos. Sendo assim, as técnicas sorológicas para detecção de anticorpos anti-*M. leprae* são principalmente direcionadas para o diagnóstico das formas multibacilares da hanseníase (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

Está claro que os anticorpos contra o PGL-I refletem a carga bacilar do indivíduo, mostrando infecção subclínica ou doença (KLATSER, 1994). Triagem sorológica e

seguimento de contatos domiciliares de pacientes de hanseníase são instrumentos úteis para a detecção precoce de casos novos. Além disso, estima-se que a sorologia possa ser benéfica na mensuração do tamanho da endemia hanseníase em uma dada população, embora este papel não esteja ainda bem definido (BUHRER-SÉKULA, 2008). Porém, o resultado do teste sorológico deve estar associado a outras informações clínicas para que se possa concluir um diagnóstico da doença (BUHRER-SÉKULA, 2008).

2.4.2 Estudos populacionais utilizando a sorologia anti-PGL-1

O emprego da sorologia anti-PGL-I como um instrumento para o diagnóstico da infecção com o *M. leprae* em indivíduos sadios tem sido utilizado em diversos inquéritos sorológicos (BAGSHAWE et al., 1990; BAUMGART et al., 1993; PONNIGHAUS et al., 1994) e em estudos de contatos de hanseníase e controles sadios (VIJAYAKUMARAN et al., 1998; MATOS et al., 1999). Em áreas endêmicas, estudos demonstraram que a positividade ao PGL-I variou de acordo com a prevalência local de hanseníase, indicando a capacidade do teste em demonstrar a exposição da população ao *M. leprae* (MOET et al., 2006; BAGSHAWE et al., 1990; SINAN, 2007). Esses trabalhos confirmam que a infecção subclínica é mais comum do que a doença propriamente dita.

A maioria dos trabalhos publicados até o momento empregou a técnica ELISA, que exige laboratórios e profissionais capacitados (DUPPRE, 2008).

Fine (1990) encontrou 1% de soropositividade anti-PGL-I em 5.864 indivíduos sem a doença hanseníase em Malawi. Não houve diferença na taxa soropositividade em

contatos domiciliares de casos de hanseníase quando comparada à taxa de soropositividade nos não-contatos.

Cartel et al. (1990) estudaram 3.567 indivíduos na Polinésia Francesa, que correspondiam a 96% da população de duas ilhas, Marquesas do Sul e Maupiti. Na ilha Marquesas do Sul 119 indivíduos (4,4 %) dos 2.558 examinados apresentaram anticorpos anti-PGL-I positivo; na ilha Maupiti 38 indivíduos (4,3%) dos 852 que se submeteram à pesquisa apresentaram anticorpos anti-PGL-I positivo. Os autores, na época, especulavam sobre a possível reação cruzada com outros antígenos e concluíram ser duvidosa a utilidade da dosagem de IgM anti-PGL-I por ELISA para a detecção de infecção por *M. leprae* em programas de controle de hanseníase.

Groenen et al. (1990) realizaram a sorologia anti-PGL-I em moradores de uma área de um antigo Hospital Colônia no Zaire. Dos 1.275 indivíduos que não apresentavam hanseníase, 29 (2,3%) tinham sorologia anti-PGL-I positiva.

Douglas et al. (1992) verificaram a ocorrência de produção de anticorpos anti-PGL-I em uma área endêmica (Filipinas) e em outra área não endêmica (Estados Unidos) utilizando quatro antígenos semi-sintéticos. Nesse estudo os autores concluíram que a sororreatividade anti-PGL-I é eficiente para auxiliar no diagnóstico, além de ser útil na triagem em contatos domiciliares de hanseníase e em populações de área endêmica.

Em estudo populacional realizado nas Filipinas (área endêmica) e na Coreia (área não endêmica), Cho et al. (1992) verificaram que a presença de anticorpos anti-PGL-I nos contatos (Filipinas-13,4% e Coreia-8%) é estatisticamente igual à dos controles (Filipinas-10,8% e Coreia- 4,8%), indicando que tanto os contatos quanto a população geral estão igualmente expostos ao *M. leprae*. Esse estudo também

demonstrou que a soroprevalência de anticorpos anti-PGL-I era significativamente maior no país endêmico que no não endêmico.

Em trabalho realizado por Cellona et al. (1993), também nas Filipinas, encontrou-se positividade para anticorpos anti-PGL-I em 1,7% dos pacientes da população geral. Quando o ELISA foi comparado ao índice bacilar dos pacientes multibacilares, estes dois mostraram forte correlação.

Tanto no estudo de Cho et al. (1992) quanto no de Cellona et al. (1993) o antígeno utilizado foi o ND-O-BSA.

Em 1996, González-Abreu et al. estudaram a reatividade sorológica anti-PGL-I visando a detecção precoce da hanseníase em uma área de baixa endemicidade e encontraram 3,8% de soropositividade.

van Beers et al. (1994) realizaram na Indonésia, área endêmica para hanseníase, a sorologia anti-PGL-I e detecção de *M. leprae* por PCR em 1.015 amostras de soro e 1.228 amostras de swab nasal. A taxa de soropositividade anti-PGL-I encontrada na população foi de 30,8% e não houve diferença no resultado entre os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase e os que não eram contatos. A presença de *M. leprae* por PCR, foi demonstrada em 7,8% dos espécimes de esfregaços nasais e não houve correlação entre os resultados da PCR e sorologia. Os autores concluíram que a presença do *M. leprae* é generalizada na população e que em áreas endêmicas muitos indivíduos carregam o microorganismo em suas cavidades nasais sem ter sintomas evidentes da hanseníase.

Bakker et al. (2004) examinaram 3.986 pessoas para hanseníase em 5 ilhas da Indonésia com alta endemicidade. Dessas, 3.271 coletaram sangue para dosar

anticorpos anti-PGL-I e 98 (3%) apresentaram anticorpos anti-PGL-I positivo. A soroprevalência variou entre ilhas (1,7-8,7%) e teve uma relação significativa com a prevalência da doença. Nessa área altamente endêmica para a hanseníase, não só contatos domiciliares de pacientes soropositivos anti-PGL-I, mas também as pessoas que vivem nas proximidades de um paciente soropositivo eram mais propensas a abrigar anticorpos contra *M. leprae*.

Em novo estudo, Bakker et al. (2006), demonstraram que na área com alta endemicidade estudada, os contatos de pessoas que carregavam o *M. leprae* na cavidade nasal (PCR) apresentavam um risco maior de desenvolver a hanseníase. Além disso, todos os pacientes com hanseníase que apresentaram PCR positivo para *M. leprae* também foram soropositivos para PGL-I, o que indica que a sorologia anti-PGL-I parece ser ferramenta adequada para identificar esses pacientes. O aumento do risco de pessoas com sorologia positiva anti-PGL-I de desenvolver hanseníase também oferece importante instrumento para identificar pessoas que provavelmente funcionarão como transmissoras da doença.

Stefani et al. publicaram, em 2012, estudo que investigou 50 indivíduos no Nepal e 50 no Brasil, encontrando em ambos os grupos analisados 2% de positividade para anticorpos anti-PGL-I.

Silva et al. (2008) compararam os padrões de resultados de dois testes sorológicos, ML flow e ELISA, em países endêmico (Brasil) e não endêmico (Chile). No Brasil, a dosagem de anticorpos anti-PGL-I por ELISA foi positiva em 5 (6,9%) dos 72 indivíduos saudáveis estudados e no Chile foi positiva em 1 (3,3%) de 30 indivíduos saudáveis estudados. O MLflow apresentou resultados semelhantes ao ELISA. A

positividade de ambos os testes variou de acordo com o nível de endemicidade da área geográfica onde o teste foi aplicado.

Brasil et al. (2003) fizeram o teste sorológico anti-PGL-I em 6.520 pessoas, pertencentes ao universo de 7.416 habitantes da área urbana de um município paulista caracterizado por elevada endemicidade de hanseníase, e as acompanharam durante quatro anos. Foi identificado um grupo de 590 indivíduos com sorologia anti-PGL-I positiva (9,0 %). No período, foram diagnosticados 82 casos novos de hanseníase, 74 pertenciam ao grupo submetido ao teste sorológico no início do estudo, sendo 26 no grupo de soropositivos (441 casos novos/10.000 indivíduos) e 48 no de soronegativos (81/10.000). A condição de soropositividade isolada respondeu pela elevação de 4,4 vezes no risco de adoecer entre os indivíduos não-contatos com hansenianos, estimativa que subiu para 8,6 vezes nos contatos. Os autores concluíram que a positividade sorológica anti-PGL-I representou um maior risco de adoecimento por hanseníase.

No estudo realizado por Frota et al. (2010) a soropositividade anti-PGL-I foi semelhante entre os casos de contato de hanseníase (15,8%) e casos de não contato com hanseníase (15,1%). O estudo concluiu que a dosagem de anticorpos anti-PGL-I não é útil para diferenciar os contatos dos não contatos de hanseníase em áreas endêmicas, bem como que a sorologia PGL-I serviria para auxiliar o diagnóstico precoce da hanseníase através do monitoramento da população com soropositividade anti-PGL-I.

Hungria et al. (2012) publicaram estudo de sororreatividade em diferentes regiões endêmicas do Brasil. Em Goiânia, área endêmica, 1 (2,22%) dos 45 indivíduos estudados tinha PGL-I positivo, e em Rondonópolis, área hiperendêmica, 25 (8,86%)

dos 282 eram PGL-I positivos, o que demonstra a relação entre a soropositividade anti-PGL-I com a incidência da hanseníase.

Pelo que se percebe, os resultados da sorologia anti-PGL-I (que foi dosada, nos estudos dantes referidos, para a demonstração de infecção subclínica) são bastante dispares, tanto em países endêmicos, quanto nos países não endêmicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Estudos populacionais de prevalência de infecção subclínica de hanseníase utilizando a sorologia anti- PGL-I

ANO	AUTOR	PAÍS	ENDEMIAS	TÉCNICA/Ag	PGL-I +	PGL-I+/%
1988	Fine	Malawi	End	ELISA DBSA	45/5076	0,9%
1990	Cartel	Polinésia francesa	End	NT-P-BSA	157/3567	4,3%
1990	Groenem	Zaire	End	DBSA	29/1524	2,9%
1992	Douglas	Filipinas	End	NT-O-BSA	10/398	2,5%
				ND-O-BSA	5/398	1,3%
				ND-P-BSA	6/398	1,5%
				NT-P-BSA	6/398	1,5%
1992	Cho	Filipinas	End	ND-O-BSA	65/604	10,8%
1993	Cellona	Filipinas	End	ND-O-BSA	7/401	1,7%
1992	Cho	Coreia	N end	ND-O-BSA	54/1132	4,8%
1992	Douglas	EUA	N end	NT-P-BSA	7/426	1,6%
				NT-O-BSA	6/426	1,4%
				ND-O-BSA	4/426	0,7%
				ND-P-BSA	6/426	1,4%
1996	Gonzalez-Abreu	Cuba	B end	ND-A-BSA	905/23863	3,8%
1994	Van Beers	Indonésia	A end	NT-P-BSA	313/1015	30,8%
2004	Bakker	Indonésia	N end	NT-P-BSA	67/959	7%
			A end		98/3271	3%
2006	Bakker	Indonésia	A end	NT-P-BSA	96/3186	3%
2012	Stefani	Nepal	End	ML-Flow NT-P-BSA	1/51	2%
2008	Silva	Chile	N end	NT-P-BSA	1/30	3,3%
2003	Brasil	Brasil	End	Dissacarídeo-acrilamina	590/6520	9%
2008	Silva	Brasil	End	NT-P-BSA	5/72	6,9%
2010	Frota	Brasil	H end	DBSA	48/317	15,1%
2012	Stefani	Brasil	End	ML-Flow NT-P-BSA	1/50	2%
2012	Hungria	Brasil (Goiânia e Rondonópolis)	End H end		1/45 (G) 25/282(R)	2% 9%

Legenda: "N", não endemia; "B", baixa endemia; "End", endemia; "A", alta endemia; "H", hiperendemia

2.4.3 Detecção de anticorpos anti-PGL-I em pacientes infectados pelo HIV

Encontramos apenas um trabalho que estudou a soroprevalência de *M. leprae* em pacientes infectados pelo HIV, os estudos sobre coinfeção citados nos tópicos anteriores contemplam a pesquisa da infecção pelo HIV em hansenianos, ao passo que este trabalho, assim como o estudo adiante relacionado, percorre o caminho inverso, pesquisando a infecção subclínica pelo *M. leprae* em pacientes infectados pelo HIV.

Gonzalez-Abreu et al. (1993) fizeram a dosagem de anticorpos anti-PGL-I (ELISA com antígeno ND-A-BSA) em 3 grupos. No grupo de pacientes infectados pelo HIV, 14,8% (65/437) apresentaram sorologia anti-PGL-I positiva; no grupo de doadores de sangue, 1,3% (4/313); e no grupo populacional, 3,02% (423/13.970) apresentaram anticorpos anti-PGL-I positivo. Nesse estudo, realizado em Cuba, a taxa de sororreatividade anti-PGL-I dos indivíduos infectados pelo HIV era significativamente mais alto que no grupo controle. Foi também digno de nota que as densidades óticas superiores a 0,4 no grupo infectado pelo HIV (3,20%) foram encontradas dez vezes mais que na população endêmica (0,33%). Esse estudo concluiu que os profissionais de saúde teriam que estar atentos para (i) a fonte de infecção silenciosa encontrada, (ii) os inesperados efeitos do HIV que poderiam surgir em uma área endêmica da hanseníase e (iii) a imunossupressão induzida por HIV que poderia aumentar a prevalência de formas multibacilares (GONZALEZ-ABREU et al., 1993).

3 OBJETIVOS

1- Conhecer a taxa de infecção subclínica pelo *M. leprae* através da pesquisa de anticorpos IgM anti-PGL-I nos pacientes infectados pelo HIV (grupo caso) e nos pacientes não infectados pelo HIV (grupo controle).

2- Verificar a associação do resultado da sorologia anti-PGL-I com o estado de imunossupressão, através da contagem de linfócitos CD4+, carga viral e uso ou não de HAART, em pacientes infectados pelo HIV.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal analítico, referente à pesquisa sérica de anticorpos IgM anti-PGL-I por teste ELISA em um grupo composto por pacientes infectados pelo HIV e em outro grupo composto por pacientes não infectados.

4.2 POPULAÇÃO/CASUÍSTICA DO ESTUDO

Foram constituídos dois grupos de estudo: um grupo caso, composto por pacientes infectados pelo HIV, e um grupo controle, composto por pacientes não infectados pelo HIV. Todos os pacientes incluídos no estudo eram moradores da Região Metropolitana da Grande Vitória, no estado do Espírito Santo.

4.3 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

4.3.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV)

Abordagem dos pacientes: foram convidados a participar do estudo os pacientes dos Serviços de HIV/AIDS e de Pesquisa Clínica em Dermatologia, e também os pacientes que estavam na fila da coleta de sangue para a realização das contagens de linfócitos CD4+ e carga viral, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital

Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), em Vitória, no estado do Espírito Santo (período: entre agosto de 2010 e fevereiro de 2012).

Coleta das amostras biológicas: foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM (período: entre agosto de 2010 e fevereiro de 2012).

Coleta de dados: foi realizada durante a abordagem dos pacientes, através da análise de prontuários médicos, do Sistema de Controle de Exames Laboratoriais de CD4/CD8 e Carga Viral (SISCEL) e do Sistema de Controle Logístico de Medicamentos Antirretrovirais (SICLOM) (período: entre agosto de 2010 e fevereiro de 2012; revisão dos dados: entre julho e setembro de 2013).

Armazenamento das amostras: as amostras foram armazenadas no Núcleo de Doenças Infecciosas, em Vitória, no estado do Espírito Santo.

Realização da Sorologia anti-PGL-I: os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia Celular da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, em julho de 2012.

4.3.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV)

Abordagem dos pacientes: foram convidados a participar do estudo os pacientes que estavam na fila da coleta de sangue de rotina solicitada por outros ambulatórios do hospital (período: setembro e outubro de 2013).

Coleta das amostras biológicas: foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM (período: setembro e outubro de 2013).

Coleta de dados: foi realizada durante a abordagem dos pacientes (período: setembro e outubro de 2013).

Armazenamento das amostras: as amostras foram armazenadas no Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES.

Realização da Sorologia anti-PGL-I: os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia Celular da Fundação Oswaldo Cruz (período: novembro de 2013).

4.3.3 Terceira fase (pareamento)

Foi realizado pareamento dos grupos (639 infectados pelo HIV e 641 não infectados pelo HIV) de acordo com o gênero e idade, para uma melhor avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-PGL-1. Com o pareamento, foram selecionados 350 pacientes em cada grupo, configurando, assim, o modelo de amostragem por conveniência.

4.4 DINÂMICA DAS COLETAS DE DADOS E AMOSTRAS

4.4.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV)

Foram convidados a participar do estudo os pacientes infectados pelo HIV que procuraram o Ambulatório de Pesquisa Clínica em Dermatologia e os pacientes que foram coletar sangue no Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM, para realizar

os exames de contagens de linfócitos CD4+ e carga viral. O Laboratório reserva dias, horários e local específicos para a coleta desses exames.

Na abordagem ao paciente, explicamos sobre o que consistia a pesquisa, e ao assinarem o termo de consentimento anotamos o número do documento, o sexo e a data de nascimento/idade. Posteriormente, consultamos seus prontuários, o SISCEL e o SICLOM em busca dos dados necessários à realização da pesquisa.

4.4.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV)

Para formar o grupo controle, foram convidados, aleatoriamente, a participar do estudo os pacientes que estavam na fila da coleta de sangue de rotina solicitada por outros ambulatórios do hospital, no Laboratório de Análises Clínicas do HUCAM. Na abordagem ao paciente, explicamos sobre o que consistia a pesquisa, e ao assinarem o termo de consentimento, anotamos o número do documento, o sexo e a data de nascimento/idade. Posteriormente, fizemos o teste rápido "HIV Rapid Check" nos soros.

4.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

4.5.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV)

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de infecção pelo HIV/AIDS, confirmados pelos métodos ELISA e Western Blot, que estivessem em qualquer fase

da infecção pelo HIV, com ou sem uso de terapia anti-retroviral, de ambos os sexos, acima de 18 anos e moradores da RMGV.

4.5.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV)

Foi formado o grupo controle, composto por indivíduos procedentes da mesma área geográfica, com teste rápido "HIV Rapid Check" negativo.

4.5.3 Terceira fase (pareamento)

Foram incluídos na terceira fase do estudo, os indivíduos selecionados no pareamento em relação ao gênero e idade.

4.6 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

4.6.1 Primeira fase (639 pacientes infectados pelo HIV)

Não houve exclusão na primeira fase.

4.6.2 Segunda fase (641 pacientes não infectados pelo HIV)

Foram excluídos indivíduos do grupo controle que apresentaram teste rápido "HIV Rapid Check" positivo.

4.6.3 Terceira fase (Pareamento)

Foram excluídos os indivíduos não selecionados no pareamento por amostragem por conveniência.

4.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

4.7.1 Coleta e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico em tubos vacutainer sem heparina, na quantidade de 10 mililitros, incubadas a temperatura ambiente e, então, processadas para obtenção do soro. Para tanto, o sangue foi centrifugado a 900 x g, sem freio, a 4°C durante 10 minutos. O soro obtido foi aliquoteado e estocado a -20°C, para posterior dosagem de anticorpos específicos por ensaio imunoenzimático (ELISA).

4.7.2 Técnica de ELISA anti-PGL-I

O ensaio imunoenzimático ELISA foi realizado no Laboratório de Microbiologia Celular da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), com a finalidade de detectar anticorpos IgM anti-PGL-I ("phenolicglycolipid I" – glicolípido fenólico I). Esse antígeno está presente na parede celular do *M. leprae*.

Em uma microplaca de 96 poços com fundo chato, para a quantificação de anticorpos IgM anti-PGL-I, foi feita a adsorção do D-BSA (antígeno), o qual estava a 0,25 µl/mL em cada poço (1:4000 partindo de estoque a 1 mg/ml).

Foram adicionados 50 µl/poço do antígeno previamente diluído em tampão carbonato/bicarbonato 0,1M pH 9,5, incubando-se a microplaca na geladeira por no mínimo 24 horas (“overnight”).

Ao término da incubação, os poços foram lavados 3 vezes com 200 µl de tampão PBS-tween 20 a 0,3% (PBS/T), e então foram bloqueados com BSA 3% em TBS/T por 1 hora a 37°C.

Os poços foram novamente lavados 3 vezes com 200 µl de TBS/T.

Adicionou-se 50 µl de soro diluído 1:200 em BSA 1%, incubando-se por 1 hora a 37°C.

Os poços novamente foram lavados 3 vezes com PBS/T e adicionou-se à placa o anticorpo IgM anti-PGL-I (Sigma), previamente diluído em 1:2500 em solução PBS-T com 1% de BSA.

Após incubação a 37°C por 1 hora, os poços foram lavados 4 vezes com PBS/T adicionando-se 100 µL do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma).

A reação, que tem como resultado a mudança de cor da placa, foi interrompida com a adição de 50µl de ácido sulfúrico 2,5 N e leitura com densidade óptica de 450 nm (OD 450nm – “optical density”) de um soro controle positivo que alcance um valor de 0,6. Todos os soros foram experimentados em duplicata e os resultados obtidos pela técnica de ELISA foram expressos como média da absorbância das duplicatas.

O ponto de corte para positividade foi de 0,25. Assim, foram considerados como pacientes com anticorpos anti-PGL-I negativos os que apresentaram densidade óptica (D.O.) com valor inferior a 0,25, como pacientes com anticorpos anti-PGL-I positivo fraco os que apresentaram D.O. entre 0,25 e 0,4 e como pacientes com anticorpos anti-PGL-I positivo forte os que apresentaram D.O. maior que 0,4 (Tabela 3).

Tabela 3 – Ponto de corte para positividade da sorologia anti-PGL-I

Sorologia anti-PGL-I	D.O.
Negativo	< 0,25
Positivo fraco	Entre 0,25 e 0,4
Positivo forte	> 0,4

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado pareamento após a conclusão da sorologia dos pacientes (639 indivíduos infectados pelo HIV e 641 não infectados). Portanto, utilizou-se amostragem por conveniência.

Foi feita a estratificação das variáveis: faixa etária (20 à 39 anos, 40 à 59 anos e 60 anos ou mais), CD4 (maior que 500, entre 350 e 500, menor que 350), carga viral (detectável e indetectável), uso de HAART (sim, não).

Para avaliar a positividade para PGL-I entre os dois grupos estudados, empregou-se o teste qui-quadrado para proporções. Na comparação das variáveis métricas entre dois grupos foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, pois a hipótese de normalidade foi rejeitada para aplicação de um teste paramétrico. A significância estatística adotada foi de 5% (0,050). Foi feita análise bivariada do cruzamento entre variáveis categóricas e a técnica estatística usada foi de tabelas cruzadas com teste

5 RESULTADOS

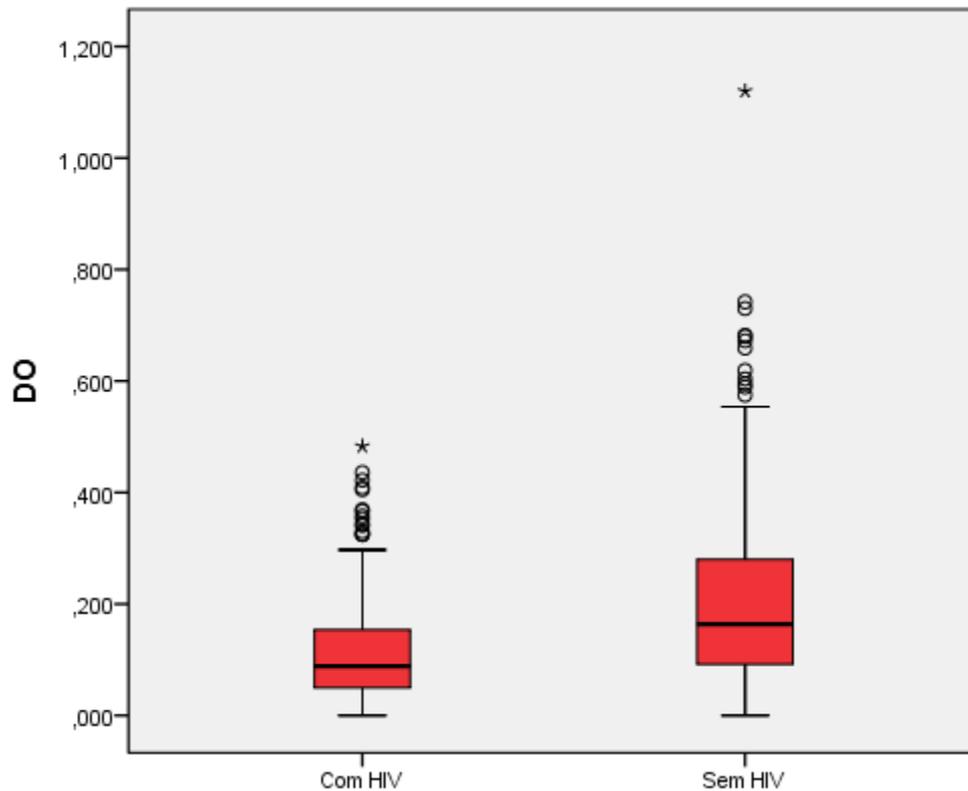
Participaram do estudo 350 pacientes infectados pelo HIV (grupo caso) e 350 pacientes não infectados pelo HIV (grupo controle), num total de 700 pacientes. Ambos os grupos foram compostos por pacientes provenientes das mesmas regiões, qualificadas como áreas endêmicas tanto para hanseníase quanto para HIV, situadas na região metropolitana da Grande Vitória, no estado do Espírito Santo, no Brasil.

Dos 350 pacientes infectados pelo HIV (grupo caso), 21 (6%) apresentaram PGL-I positivo, sendo que dos 350 indivíduos não infectados pelo HIV (grupo controle), 102 (29,1%) eram PGL-I positivo (Tabela 4). Houve diferença estatisticamente significativa ($p\text{-valor} < 0,05$).

Tabela 4 – Resultado da sorologia anti-PGL-I nos grupos infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV

PGL-I	Grupo				p-valor
	Infectados pelo HIV		Não infectados pelo HIV		
	N	%	N	%	
Negativo	329	94,0	248	70,9	0,000
Positivo fraco	16	4,6	60	17,1	0,000
Positivo forte	5	1,4	42	12,0	0,000
Total	350	100,0	350	100,0	-

Na Figura 1 podemos observar os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I presentes no soro de todos os indivíduos incluídos no estudo. Embora haja uma heterogeneidade nas respostas, é possível observar a diferença no nível dessa resposta entre os grupos. O gráfico mostra o centro (mediana) da distribuição dos dados, assim como a dispersão e distribuição dos dados e a presença ou não de *outliers*. Como o tamanho amostral de cada grupo é relativamente pequeno, os valores atípicos exercem grande influência na média, distorcendo a verdadeira natureza da distribuição.

Figura 1 - Distribuição do D.O. nos grupos infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV

Os indivíduos de ambos os grupos vieram de uma mesma área geográfica e foram pareados de acordo com idade e gênero (Tabela 5).

Tabela 5 - Pareamento dos grupos infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV.

Variáveis	Grupo				p-valor
	Infectados pelo HIV		Não infectados pelo HIV		
	N	%	N	%	
Sexo					
Masculino	137	39,1	137	39,1	0,938
Feminino	213	60,9	213	60,9	0,938
Faixa etária					
20 a 39 anos	122	34,9	122	34,9	0,937
40 a 59 anos	197	56,3	197	56,3	0,939
60 anos ou mais	31	8,9	31	8,9	0,894
Residência					
Cariacica	81	23,1	90	25,7	0,476
Guarapari	22	6,3	7	2,0	0,008
Serra	66	18,9	86	24,3	0,100
Viana	18	5,1	17	4,9	0,958
Vila Velha	83	23,7	53	15,1	0,005
Vitória	80	22,9	98	28,0	0,144
Total	350	100,0	350	100,0	-

Em uma análise do grupo infectado pelo HIV com PGL-I positivo, 81% estavam usando HAART (terapia anti-retroviral altamente ativa), 85,7% tinham contagem de células CD4+ superiores a 350 e 71,4% tinham carga viral indetectável. A positividade anti-PGL-I foi mais frequente no grupo masculino ($p < 0,05$). As variáveis contagem de linfócitos T CD4+, carga viral e o uso ou não de HAART não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os pacientes PGL-I negativos e PGL-I positivos (Tabela 6).

Tabela 6 – Perfil epidemiológico e estado imunológico dos pacientes infectados pelo HIV

Variáveis	Pacientes infectados pelo HIV				p-valor
	anti-PGL-I negativo		anti-PGL-I positivo		
	N	%	N	%	
Uso TARV					
Sim	297	90,3	17	81,0	0,322
Não	32	9,7	4	19,0	0,322
CD4					
Maior que 500	193	58,7	14	66,7	0,621
Entre 350 e 500	58	17,6	4	19,0	0,895
Menor que 350	78	23,7	3	14,3	0,469
Carga viral					
Indetectável	205	62,3	15	71,4	0,546
Detectado	124	37,7	6	28,6	0,546
Sexo					
Masculino	124	37,7	13	61,9	0,049
Feminino	205	62,3	8	38,1	0,049
Faixa etária					
20 a 39 anos	112	34,0	10	47,6	0,302
40 a 59 anos	186	56,5	11	52,4	0,888
60 anos ou mais	31	9,4	0	0,0	0,264
Total	329	100,0	21	100,0	-

6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, com o objetivo de investigar as taxas de infecção subclínica pelo *M. leprae* em indivíduos infectados pelo HIV, empregamos o recurso disponível mais estudado e padronizado para esse propósito, que é dosagem de anticorpos IgM anti-PGL-I. Utilizando esse método obtivemos no grupo infectado pelo HIV taxa de soropositividade anti-PGL-I de 6%, enquanto no grupo controle (não infectado pelo HIV) essa taxa foi de 29,1%, ou seja, no grupo controle a soropositividade anti-PGL-I foi cerca de cinco vezes maior que no grupo infectado pelo HIV.

Nossos resultados se opõem aos encontrados no estudo realizado em Cuba por Gonzalez-Abreu et al. (1993), que descrevem uma maior porcentagem de positividade anti-PGL-I em indivíduos infectados pelo HIV que no grupo controle. Nesse estudo, os autores dividiram a dosagem de anticorpos anti-PGL-I em 3 grupos: no grupo infectado pelo HIV, 14,8% (65/437) tinham PGL-I positivo; no grupo de doadores de sangue (supostamente não infectado pelo HIV), 1,27% (4/313); e no grupo populacional, 3,02% (423/13.970) (GONZALEZ-ABREU et al., 1993). Outra divergência verificada no nosso estudo foi o achado de densidades óticas superiores a 0,4 dez vezes mais no grupo infectado pelo HIV quando comparadas com o grupo controle, enquanto encontramos $DO > 0.4$ oito vezes mais no grupo controle.

A sororreatividade a antígenos do *M. leprae* é considerada efetiva para avaliar tanto a exposição quanto a infecção pelo microorganismo (CHO et al., 2001; OSKAM, 2003; MARTINS et al., 2010; LOBATO et al., 2011; DUTHIE et al., 2011).

O emprego da sorologia anti-PGL-I como um instrumento para o diagnóstico da infecção pelo *M. leprae* em indivíduos sadios tem sido utilizado em inquéritos

sorológicos (BAGSHAWE et al., 1990; BAUMGART et al., 1993; VAN DER BROEK et al., 1997) e em estudos de contatos de hanseníase e controles sadios (VIJAYAKUMARAN et al., 1998; MACHADO et al., 1998). Em áreas endêmicas, estudos demonstraram que a positividade anti-PGL-I variou de acordo com a prevalência local de hanseníase, indicando a capacidade do teste em demonstrar a exposição da população ao *M. leprae* e confirmando que a infecção subclínica é mais comum do que a doença propriamente dita (BAGSHAWE et al., 1990; MOET et al., 2006).

Em nosso grupo controle (não infectados pelo HIV), a soropositividade anti-PGL-I de 29,1% foi superior à maioria dos estudos de áreas endêmicas, de alta endemicidade e de hiperendemicidade (FINE et al., 1988; CARTEL et al., 1990; GROENEN et al., 1990; DOUGLAS et al., 1992; CELLONA et al., 1993; VAN BEERS et al., 1994; GONZALEZ-ABREU et al., 1996; VAN BEERS et al., 1999; BRASIL et al., 1998; BAKKER et al., 2004; BAKKER et al., 2006; SILVA et al., 2008; BUHRER-SÉKULA et al., 2008; FROTA et al., 2010; BARRETO et al., 2011; BARRETO et al., 2012; STEFANI et al., 2012; HUNGRIA et al., 2012). Esse achado não pode ser negligenciado quando consideramos que o *M. leprae* está em circulação nessa região e que esses indivíduos assintomáticos participam da cadeia de transmissão, favorecendo a exposição de indivíduos susceptíveis ao bacilo.

Entretanto, o fato de encontrarmos apenas 6% de soropositividade anti-PGL-I nos pacientes infectados pelo HIV é intrigante, em especial porque pareamos os dois grupos (infectados pelo HIV e não infectados pelo HIV) em relação à área geográfica, gênero e idade.

Os resultados do nosso estudo sugerem que em indivíduos infectados pelo HIV a resposta imune contra antígenos de *M. leprae* é baixa provavelmente devido à desregulação dos linfócitos B. Essa hipótese pode ser sustentada com base no fato de que alguns pacientes infectados pelo HIV, portadores de toxoplasmose ou micoses profundas, apresentam sorologia duvidosa provavelmente devido à deficiência de produção de anticorpos contra esses agentes infecciosos (SINGH et al., 1996; BHASKAR, 2005; MAREJON et al., 2009). Portanto, os indivíduos infectados pelo HIV, juntamente com os indivíduos não infectados pelo HIV que apresentaram sorologia anti-PGL-I positiva mas são assintomáticos podem estar contribuindo para a circulação de *M. leprae* no ambiente.

Dos 21 indivíduos infectados pelo HIV que apresentaram sorologia PGL-I positiva, 81% estavam em uso HAART, 85,7% deles apresentavam contagem de células CD4+ superiores a 350 e 71,4% tinham carga viral indetectável. Entretanto, da análise dessas variáveis não resultou diferença estatística significativa entre o estado de imunossupressão dos pacientes e o resultado da sorologia anti-PGL-I (Tabela 2). Esperávamos que com o uso de HAART a produção de anticorpos anti-PGL-I aumentaria devido à reconstituição imune com um novo reconhecimento do PGL-I, ou pelo aperfeiçoamento de um sistema de reconhecimento latente. Porém, essa expectativa não se confirmou. Sabe-se que nos casos de infecção crônica pelo HIV as células T reguladoras estão aumentadas e são reconhecidas como supressoras das respostas de células CD4 + e CD8 + antígeno específicas e também como controladoras da ativação imune inapropriada ou exacerbada induzida por patógenos (BELKAID; ROUSE, 2005; RAGHAVAN; HOLMGREN, 2005). Após a atividade da HAART, as células T CD8+ aumentam juntamente com a produção de anticorpos, demonstrando uma ativação das células T. As células T

CD8 + supressoras produzem interleucina 4, favorecendo a produção de anticorpos. Portanto, o resultado encontrado em nosso estudo é um paradoxo.

A dosagem de anticorpos IgM anti-PGL-I apresenta especificidade de 98% e sensibilidade de 80-100% nos pacientes multibacilares, e sensibilidade de apenas 14-40% nos pacientes paucibacilares (OSKAM et al., 2003). Essa limitação metodológica poderia interferir não apenas em nosso estudo como naqueles anteriormente realizados com o mesmo propósito.

Estudos sugerem que a pesquisa do *M. leprae* na mucosa nasal por PCR e a dosagem de anticorpos anti-PGL-I seriam em conjunto um bom método para verificar infecção subclínica de hanseníase (GOULART; GOULART, 2008). Planejamos inicialmente coletar material da mucosa nasal, para detecção de *M. leprae* através do método de amplificação do DNA pela técnica de PCR, mas não o realizamos devido a não aderência dos pacientes ao exame no momento da abordagem. Entretanto, consideramos que a impossibilidade da realização do exame não compromete os resultados aqui apresentados. Afinal, caso fosse encontrado o DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal, isso não necessariamente significaria infecção, mas simplesmente o transporte do bacilo, podendo esse indivíduo ser apenas um vetor passivo. Além disso, métodos para detecção de *M. leprae* com base em técnicas de amplificação de ácidos nucleicos apresentam baixa sensibilidade (DONOGHUE et al., 2001; JADHAVI et al., 2001; TORRES et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004; BANG et al., 2009; BANERJEE et al., 2010). Por esses motivos, não se pode afirmar, com a necessária segurança, que esse teste seja determinante para a realização de estudos de detecção de infecção subclínica de hanseníase (PATTYN et al., 1993; DE WITT et al., 1993; PATROCINIO et al., 2005).

Portanto, nosso estudo indica que houve uma menor produção de anticorpos anti-PGL-I em indivíduos infectados pelo HIV, que pode indicar uma baixa taxa de infecção subclínica por *M. leprae* ou uma baixa produtividade específica desses anticorpos, ou ambas as hipóteses. A desregulação de linfócitos B em indivíduos infectados pelo HIV pode ser a causa da baixa produção de anticorpos anti-PGL-I.

7 CONCLUSÕES

- O grupo formado por pacientes infectados pelo HIV apresentou taxa de soropositividade anti-PGL-I significativamente menor que o grupo de indivíduos não infectados pelo HIV.
- Não houve correlação do estado de imunossupressão do paciente com o resultado da sorologia anti-PGL-I.
- Os indivíduos infectados pelo HIV, juntamente com os indivíduos não infectados pelo HIV que apresentaram sorologia anti-PGL-I positiva mas são assintomáticos podem estar contribuindo para a circulação de *M. leprae* no ambiente.

8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, E. C. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(5): 509-511, 2004

ANDRADE, V. L. et al. Incidence of HIV-1 in leprosy patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Leprol*, v. 10, n. 3, p. 159-163, 1997.

ANTONUCCI, G. et al. Risk factors for tuberculosis in HIV-infected persons: a prospective cohort study. *JAMA*, 274: 143-48, 1995.

ARAOZ, R. et al. Antigen discovery: a postgenomic approach to leprosy diagnosis. *Infection and Immunity* 74: 175-182, 2006.

BAGSHAW, A. F. et al. IgM serum antibodies to phenolic glycolipid-I and clinical leprosy: two years' observation in a community with hyperendemic leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 58, n. 1, p. 25-30, 1990.

BAKKER, M. I. et al. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. *Int J Epidemiol*, v. 33, n. 6, p. 1329-1336, 2004.

BAKKER, M. I. et al. Risk factors for developing leprosy: a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev*. 77(1):48-61, 2006.

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

BANG, P. D. et al. Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol* 36(5):269-276, 2009.

BARRETO, J. G. et al. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *LeprRev*, v. 82, n. 4, p. 358-370, 2011.

BARRETO, J. G. et al. High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 107, suppl.1, p. 60-67, 2012.

BASKIN, G. B. et al., Pathology of dual *Mycobacterium leprae* and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 58, n. 2, p. 358-364, 1990.

BATISTA, M. D. et al. Leprosy reversal reaction as immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 46:e56–60, 2008

BATTEGAY, M. et al. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis*, v. 6, n. 5, p. 280-287, 2006.

BAUMGART, K.W. et al. Subclinical infection with *Mycobacterium leprae* – a problem for leprosy control strategies. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 87, n. 4, p. 412-415, 1993.

BELKAID, Y; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology* 6: 353-60, 2005.

BHASKAR, R. Seronegative central nervous system toxoplasmosis in HIV/AIDS. *J Intern Med* 5 (2): 9, 2005.

BORGDORFF, M. W. et al. HIV-1 infection as a risk factor for leprosy: a case-control study in Tanzania. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 61, n. 4, p. 556-562, 1993.

BRASIL, M. T. et al. Sorologia Anti-PGL-I e risco de ocorrência de hanseníase em área de alta endemicidade do Estado de São Paulo: quatro anos de seguimento. Rev. bras. epidemiol. [online]. 2003, vol.6, n.3, pp. 262-271.

BRENNAN, P. J. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. Lepr Rev, v. 71, suppl. S, p. 50-54, 2000.

BRENNAN, P. J; BARROW, W. W. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. Int J. Lepr Other Mycobact Dis, v. 48, n. 4, p. 382-387, 1980.

BRETT, S. J. et al. Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. Clin Exp Immunol, v. 64, n. 3, p. 476-483, 1986.

BRETT, S. J. et, al. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. Clinical Exp Immunology. 52(2):271-9, 1983.

BRITTON, W. J.; Lockwood D. N. Leprosy. Lancet, v. 363, n. 9416, p. 1209-1219, 2004.

BRYCESON, A.D.M. Leprosy. In: Champion RH, Burton JL, Ebling FLG. Textbook of Dermatology. 5th Edition. Blackwell Scientific Publications. p.1065-1083, 1992.

BÜHRER-SÉKULA, S. A simple dipstick assay for leprosy: development, evaluation and application. Amsterdam: Royal Tropical Institute, 2000.

BÜHRER-SEKULA, S. Sorologia PGL-I na hanseníase. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41(2): 3-5, 2008.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol*, v. 41, n. 5, p. 1991-1995, 2003.

CARTEL, J. L. et al. Assessment of anti-phenolic glycolipid-I IgM levels using an ELISA for detection of *M. leprae* infection in populations of the South Pacific Islands. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases*, v. 58, p. 512-517, 1990.

CELLONA, R. V. et al. Cross-Sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu. The Philippines. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 61, n. 2, p. 192-198, 1993.

CHANTEAU, S. et al. Seroepidemiological study on 724 household contacts of leprosy patients in French Polynesia using disaccharide-octyl-BSA as antigen. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 55, n. 4, p. 626-632, 1988.

CHO, S. N. et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clinical Diagnostic Lab Immunology*. 8 (1): 138-142, 2001.

CHO, S. N. et al. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. *Journal Infectious Diseases*, 150:311-322, 1984.

CHO, S. N. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infectious Immunology*. 41(3):1077-83, 1983.

CHO, S. N. et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* and antibodies to the antigen in sera from leprosy patients and their contacts. *Yonsei Medicine Journal*. 29(3):219-24, 1988.

CHO, S. N. et al. Prevalence of IgM antibodies to phenolic glycolipid I among household contacts and controls in Korea and the Philippines. *Lepr Rev*, v. 63, n. 1, p. 12-20, 1992.

CHOUDHURI, K. The immunology of leprosy; unravelling an enigma. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 63, n. 3, p. 430-447, 1995.

CORSTJENS, P. L. et al. A user friendly, highly sensitive assay to detect the IFN- γ secretion by T cells. *Clinical Biochemistry* 41: 440-444, 2008.

COUPPIÉ, P. et al. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV and leprosy. *Arch. Dermatol*. 140(8): 997–1000, 2004.

COUPPIÉ, P. et al. Increased incidence of leprosy following HAART initiation: a manifestation of the immune reconstitution disease. *AIDS* 23(12), 1599–1600, 2009

CREE, I. A. et al. Reproducibility of histology in leprosy lesions. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Diseases* 56(2):296-301, 1988.

DE WIT, M. Y. L. et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microb* 31: 502-506, 1993.

DEPS, P. D. et al. Immune reconstitution syndrome associated with leprosy: two cases. *Int J Std Aids*, v. 19, suppl. 2, p. 135-136, 2008.

DEPS, P. D; Lockwood, D. N. Leprosy occurring as immune reconstitution syndrome. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 102, n. 10, p. 966-968, 2008.

DEPS, P. et al. Clinical and histological features of leprosy and human immunodeficiency virus co-infection in Brazil. *Clin Exp Dermatol*, v. 38, suppl. 5, p. 470-477, 2013.

DEPS, P. D. et al. Rapid HIV testing among leprosy patients: a Brazilian Experience. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 102, suppl. 8, p. 749-751, 2008.

DEPS, P. D. Lockwood, D. N. Leprosy presenting as immune reconstitution inflammatory syndrome: proposed definitions and classification. *Lepr Rev*, v. 81, n. 1, p. 59-68, 2010.

DISSANAYAKE, S. et al. Evaluation of the significance of antibodies to PGL-I of *Mycobacterium leprae* in leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 51, p. 658-659, 1983.

DOCKRELL, H. M. et al. Report on the sixth meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held in Beijing, China on 23-25 August 2010. *Lepr Rev* 82: 80-85, 2011.

DONHAM, K. J.; LEININGER, J. R. Spontaneous leprosy-like disease in a chimpanzee. *J Infect Dis*, v. 136, n. 1, p. 132-136, 1977.

DONOGHUE, H. D.; HOLTON, J.; SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol* 50(2):177-182, 2001.

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

DOUGLAS, J. T. et al. Evaluation of four semi-synthetic *Mycobacterium leprae* antigens with sera from healthy populations in endemic and non-endemic areas. *Leprosy Review* 63: 199-210, 1992.

DOUGLAS, J. T. et al. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. *Clin Diagn Lab Immunol*. Sep;11(5):897-900, 2004

DRAPER, P. Structure of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*. Dec;57 Suppl 2:15-20, 1986.

DÜPPRE, N. C. et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 102, n. 7, p. 631-638, 2008.

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

DUTHIE, M. S. et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30(10):1257-1265, 2011.

EGGELTE, T. A. et al.. Use of synthetic antigens in the serodiagnosis of leprosy infection in armadillos. *Quaderni di cooperazione sanitaria. Health cooperation papers*, v. 7, p. 65-72, 1988.

FINE, P. E. et al. Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 56: 243-254, 1988.

FINE, P. E.; SMITH, P. G. Vaccination against leprosy—the view from 1996. *Lepr Rev*, 67: 249–52, 1996.

FROMMEL, D. et al. HIV infection and leprosy: a four –year survey in Ethiopia. *Lancet*, v. 344, n. 8916, p. 165-166, 1994.

FROTA, C. C. et al. Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, Jul;104 (7):490-5, 2010.

FUJIWARA, T. et al. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect Immun*, v. 43, n. 1, p. 245-252, 1984.

FUJIWARA T. et al. Chemical synthesis of the trisaccharide unit of the species-specific phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Carbohydr Res*, v. 163, p. 41-52, 1987.

GEBRE, S. et al. The effect of HIV status on the clinical picture of leprosy: a prospective study in Ethiopia. *LeprRev*, v.71, suppl. 3, p. 338-343, 2000.

GODFREY-FAUSSETT, P. et al. How human immunodeficiency virus voluntary testing can contribute to tuberculosis control. *Bulletin of the World Health Organization* 80: 939-945, 2002.

GONZÁLEZ-ABREU, E. et al. PGL-I antibody in HIV infected patients. *LeprRev*, v. 64, suppl. 3, p. 275-276, 1993.

GORMUS, B. J. et al. Interactions between simian immunodeficiency virus and *Mycobacterium leprae* in experimentally inoculated rhesus monkeys. *J Infect Dis*, 760:405-413, 1989.

GORMUS, B. J. HIV infection and leprosy. *Int. J. Leprosy*; 62: 610-611, 1994.

GORMUS, B. J. et al. Impaired responses to *Mycobacterium leprae* antigens in rhesus monkeys experimentally inoculated with simian immunodeficiency virus and *M. leprae*. *Lepr Rev*. 69: 24–39, 1996.

GOULART, I. M.; GOULART, L. R. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res*. 300(6):269-90, 2008.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Bras Med Trop*, v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

GROATHOUSE, N. A. et al. Use of protein microarrays to define the humoral immune response in leprosy patients and identification of disease-state-specific antigenic profiles. *Infection and Immunity* 74: 6458-6466, 2006.

GROENEN, G. et al. A longitudinal study of the incidence of leprosy in a hyperendemic area in Zaire, with special reference to PGL-antibody results. The Yalisombo Study Group. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases*, v. 58, n. 4, p. 641-650, 1990.

GUPTA, C. M. et al. Inoculation leprosy subsequent to dog bite. A case report. Indian J Lepr. Oct-Dec;56(4):919-20, 1984.

HALDER, A. et al. Role of paucibacillary leprosy in the transmission of disease. Indian J Lepr ; 73(1):11-5, 2001

HAN, X. et al. Synergistic stimulatory effects of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma on replication of human immunodeficiency virus type 1 and on apoptosis of HIV-1-infected host cells. Eur J Clin Invest, v. 26, n. 4, p. 286-292, 1996.

HAN, X. Y. et al. A new Mycobacterium species causing diffuse lepromatous leprosy. Am J Clin Pathol. 130(6):856-64, 2008.

HAN, X. Y; SIZER, K. C.; TAN, H. H. Identification of the leprosy agent Mycobacterium lepromatosis in Singapore. J Drugs Dermatol. Feb;11(2):168-72, 2012.

HAN, X. Y. et al. Analysis of the leprosy agents Mycobacterium leprae and Mycobacterium lepromatosis in four countries. Am J Clin Pathol. 142(4):524-32, 2014.

HORSBURGH, C. R.; MASON, U. G.; FARHI, D. C.; ISEMAN, M. D. Disseminated infection with Mycobacterium avium-intracellulare: a report of 13 cases and a review of the literature. Medicine 64, 36-38, 1985.

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

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

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

HUSSAIN, T. et al. HIV seroprevalence in leprosy patients. *Int J Lepr*, v.68, suppl. 1, p. 67-69, 2000.

HUSSAIN, T. et al. Seroprevalence of HIV infection among leprosy patients in Agra, India: trends and perspective. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v.73, suppl. 2, p. 93-99, 2005.

IMAMI, N. et al. Assessment of type 1 and type 2 cytokines in HIV type 1-infected individuals: impact of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res HumRetrov*, v. 15, n, 17, p. 1499-1508, 1999.

JADHAV, R. S. et al. Simplified PCR detection method for nasal *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 69 (4): 299-307, 2001.

JESSAMINE, P. G. et al. Leprosy-like illness in a patient with *Mycobacterium lepromatosis* from Ontario, Canada. *J Drugs Dermatol* ;11(2):229-33, 2012.

Kawuma, H. J.; Bwire, R.; Adatu-engwau, E. Leprosy and infection with the immunodeficiency virus in Uganda: a case-control study. *Int J Leprosy*, v. 62, n. 4, p. 521-526, 1994.

Kaufmann, S. H. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol*, v. 11, p. 129-163, 1993.

KEATING, S. M.; JACOBS, E. S.; NORRIS, P. J. Soluble mediators of inflammation in HIV and their implications for therapeutics and vaccine development. *Cytokine Growth F R*, v. 23, n. 4/5, p. 193-206, 2012.

KHARKAR, V. et al. Type I lepra reaction presenting as immune reconstitution inflammatory syndrome. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73(4): 253–256, 2007.

KLATSER, P. R. Serology of leprosy. *Trop Geograph Med*, v. 46, n. 2, p. 59-62, 1994.

KLEIN, J. L. et al. *Mycobacterium kansasii* and human immunodeficiency virus co-infection in London. *J. Infect*, v. 37, n. 3, p. 252-259, 1998.

KLINGMULLER, V. *Ergebnisse der Lepra forschung seit 1930*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1938.

KOSTER, F. T. et al. Cellular and humoral immune response to a phenolic glycolipid antigen (PhenGL-I) in patients with leprosy. *J Clin Microbiol.* ;25(3):551-6, 1987.

KUMAR, B.; SINHA, R.; SEHGAL, S. High incidence of IgG antibodies to phenolic glycolipid in non-leprosy patients in India. *Journal Dermatology*. 25(4):238-41, 1998.

LAGRANGE, P. H. Un aspect très actuel du destin des maladies infectieuses: la tuberculose, la lèpre, les mycobactéries opportunistes. *Bull. Acad. Natl. Med.*, v. 179, p. 805-820, 1995.

LANDAY, A. L. et al. Evidence of immune reconstitution in anti-retroviral drug-experienced patients with advanced HIV disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18 (2), 95–102, 2002.

LAWN, S. D.; WOOD, C.; LOCKWOOD, D. N. Borderline tuberculoid leprosy: an immune reconstitution phenomenon in a human immunodeficiency virus-infected person. *Clin Infect Dis*, v.36, n. 1, p. 5-6, 2003.

LEONARD, G. et al. Prevalence of HIV infection among patients with leprosy in African countries and Yemen. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 3, suppl. 11, p. 1109-1113, 1990.

LEVIS, W. R. et al. Serodiagnosis of leprosy: relationships between antibodies to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I and protein antigens. *J Clin Microbiol.* 24(6):917-21, 1986

LIENHARDT, C. et al. Effect of HIV infection on leprosy: a three years survey in Bamako, Mali. *Int J Leprosy*, v. 64, p. 383-391, 1996.

LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev* 82 (4): 389-401, 2011.

LOCKWOOD, D. N. et al. The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. *J Clin Pathol*, v. 61, n. 5, p. 595-600, 2008.

LUCAS, S. B. Human immunodeficiency virus and leprosy. *Lepr. Rev.*, v. 64, n. 2, p. 97-103, 1993.

MACHADO, P. et al. Leprosy and HIV infection in Bahia, Brazil. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 66, suppl. 2, p. 227-229, 1998.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de respostas imunes às infecções. *An bras Dermatol*, Rio de Janeiro, 79(6):647-664, 2004.

MARCHOUX, E. Un cas d'inoculation du bacille de Hansen en pays non lépreux. *Int J LeprOtherMycobactDis*, v. 2, n. 1, p. 1-7,1934.

MARTELLI, C. M. T. et al. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase. *Rev. bras. epidemiol.*, São Paulo, v. 5, n. 3, 2002.

MARTINIUK, F. et al. Leprosy as immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-positive persons. *Emerg Infect Dis* 13(9): 1438-1440, 2007.

MARTINS, A. C. et al. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol*. 76 (5): 579-587, 2010.

MATOS, H. J. et al. Epidemiologia da hanseníase em coorte de contatos intradomiciliares no Rio de Janeiro (1987-1991). *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 15, n. 3, 1999.

MEERAN, K. Prevalence of HIV infection among patients with leprosy and tuberculosis in rural Zambia. *BMJ*, v.298, n. 6670, p. 364-365,1989.

MENEZES, V. M. et al. Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series of a Brazilian cohort. *AIDS* 23(6), 641–643 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o controle da Hanseníase. 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de. Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – 8ª ed. – Brasília, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Boletim Epidemiológico AIDS/DST. 2012. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2012/52654/boletim_2012_final_1_pdf_21822.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV 2008. Suplemento II Critérios para Início do Tratamento Antirretroviral (Atualização das páginas 34-36), fevereiro 2010. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/suplemento_II_web.pdf>. Acesso em: 27 jan. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Boletim Epidemiológico AIDS/DST. Ano III- nº I, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (a). Secretaria de Vigilância em saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. Volume 44 número 11, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (b). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para adultos vivendo com HIV/AIDS. 2013.

MOET, F. J. et al. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis*, v. 193, n. 3, p. 346-353, 2006.

MOREJÓN, K. M. L.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case control study. *Am J Trop Med Hyg* 80:359–366, 2009.

MOSES, A. E.; ADELOWO, K. A.; AJAYI, B. B. Prevalence of HIV-1 infection among patients with leprosy and pulmonary tuberculosis in a semiarid region, Nigeria. *J R Soc Health*, v. 123, n. 2, p. 117-119, 2003.

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

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A. et al. Replication of human immunodeficiency virus-1 in primary human T cells is dependent on the autocrine secretion of tumor necrosis factor through the control of nuclear factor-kappa B activation. *J AllergyClinImmunol*, v. 100, n. 6, p. 838-845, 1997.

NAAFS, B. Algumas observações realizadas em 2003. *Hansen Int*, v. 29, n.1, p. 51-54, 2004.

NAAFS, B. Leprosy and HIV: an analysis. *Hansen. Int*, v. 25, n. 1, p. 63-66, 2000.

NERY, J. A. C. et al. M. leprae- HIV co-infection: pattern of immune response in vivo and in vitro. *Indian J Lepr*, v. 72, n. 2, p. 155-167, 2000.

NERY, J. A. C. et al. Reactional states in co-infected leprosy x HIV positive patients. Abstracts of the 16th International Leprosy Congress, Salvador-BA, Brazil, vol. 74, 2002.

NOORDEEN, S. K. Leprosy 1962-1992. Epidemiology and control of leprosy a review of progress over the last 30 years. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 87: 515-17, 1993.

OPROMOLLA, D. V. A., TONELLO, C. J. S., FLEURY R. N. Borderline leprosy and HIV infection. *Hansen Int.* 25, 54–59, 2000.

OREGE, P. A. et al. A case control study on human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection as a risk factor for tuberculosis and leprosy in western Kenya. *Tub Lung Dis*, v.74, suppl. 6, p. 377-381, 1993.

OSKAM, L.; SLIM, E.; BUHRER-SEKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 74: 196–205, 2003.

PATROCÍNIO, L. G. et al. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 44(3):311-6, 2005.

PATTYN S. R., et al. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr* 61: 389-393, 1993.

PEDLEY, J. C. The presence of *M. leprae* in human milk. *Lepr Rev* ;38:239-42, 1967.

PIGNATARO, P. E. et al. Leprosy and AIDS: report of two cases in the beginning of HAART and inflammatory reactions. Presented at: 16th International Congress of Leprosy. Salvador, Brazil, 4–9 August 2002.

PÖNNIGHAUS, J. M. et al. Is HIV infection a risk factor for leprosy? *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 59 (2): 221-228, 1991.

PORRITT, R. J.; OLSEN, R. E. Two simultaneous cases of leprosy developing in tattoos. *Lepr Rev*, v. 20, p. 106-111, 1948.

PORTER, J. D. Mycobacteriosis and HIV infection: the new public health challenge. *J. Antimicrob. Chemother*, v.37, Suppl.B, p. 113-120, 1996.

RAGHAVAN, S.; HOLMGREN, J. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam 44: 121–127, 2005.

REECE, S. T. et al. ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. *Clinical and Vaccine Immunology* 13: 333-340, 2006.

REES, R. J.; MC DOUGALL, A. C. Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. *J Med Microbiol.* 10 (1):63-8, 1977.

REID, A. et al. Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of tuberculosis/HIV collaboration. *Lancet Infect* 6: 483-495, 2006.

SAAD, M. H. et al. The dot-ELISA test for the detection of anti-PGL-1 IgM in leprosy patients and their contacts. *Brazilian Journal Medicine Biology Residance* 24(5):441-8, 1991.

SAMPAIO, E. P. et al. Cellular immune response to Mycobacterium leprae infection in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect Immun.* 63(5):1848-54, 1995.

SARNO, E. N. et al. HIV-M. leprae interaction: can HAART modify the course of leprosy? *Public Health Rev*, v. 123, n. 2, p. 206-212, 2008.

SELWYN, P. A. et al. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*; 320: 545–50, 1989.

SESA/ES (a). Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo - Programa Estadual de Hanseníase. Tabela de Municípios. 2013 Disponível em: <http://www.saude.es.gov.br/default.asp?pagina=17440>.

SESA/ES (b). Secretaria Estadual de Saúde do Espírito Santo. Coordenação Estadual de DST e AIDS. Situação Epidemiológica da AIDS ES. Boletim Epidemiológico nº 27 dados acumulados de dezembro de 2011 à dezembro de 2012 Espírito Santo:[s.n.]; 2013.

SEKAR, B. et al. Prevalence of HIV infection and high-risk characteristics among leprosy patients of south India; a case-control study. *Int J Lepr Other MycobactDis*, v.62, n. 4, p. 527-531, 1994.

SILVA, R. C. et al. Comportamento dos testes sorológicos ML Flow e ELISA (PGL-I) em áreas endêmica e não endêmica de hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*, v.41, n. 2, p. 19-22, 2008.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Coeficiente de Prevalência de Hanseníase por 10 mil hab. Regiões e Unidades Federadas. Brasil, 1990 a 2007. Sinan/SVS/MS, 2007.

SINGH, S.; SINGH, N.; MANIAR, J. K. AIDS associated toxoplasmosis in India and its correlation with serum tumour necrosis factor-alpha. *J Paras Dis* 20 (Supp 1):49-52, 1996.

SKINSNES, O. K. Notes from the history of leprosy. I. Interpretive chronology of leprosy concept and practice. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 41 (2): 220-33, 1973.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The Role of *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy. *Lepr Rev*, v. 82, p. 344-357, 2011.

STEFANI, M. M. A. et al. Assessment of anti-PGL-1 as a prognostic marker of leprosy reaction. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Dis.* 66: 357-364, 1998.

STEFANI, M.M.A. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41 (2): 89-94, 2008.

STEFANI, M. M. A. et al. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 1, p. 124-31, 2012.

STORNER, G. L. et al. Bordetella tuberculoid leprosy following BCG vaccination. A case report. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 49, n. 1, p. 16-20, 1981.

SUNDHARAM, J. A. Leprosy in childhood. *Indian Pediatr*, v. 27, p. 1126-1128, 1990.

TALHARI, C. et al. Leprosy and HIV coinfection: a clinical, pathological, immunological, and therapeutic study of a cohort from a Brazilian referral center for infectious diseases. *J Infect Dis* 202(3), 345–354, 2010.

TALHARI, S.; NEVES, R. G.; ORSI, A. T. Diagnóstico. *Dermatologia Tropical*. Manaus. Gráfica Tropical. 3a ed., p.103-112, 1997.

TEKLE-HAIMANOT, R. et. al. A survey of HTLV-1 and HIVs in Ethiopian leprosy patients. *AIDS* 5, n. 1, p. 108-110, 1991.

TORRES, P. et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev* 74 (1): 18-30, 2003.

TRINDADE, M. A. et al. Two patients coinfecting with *Mycobacterium leprae* and human immunodeficiency virus type 1 and naive for antiretroviral therapy who exhibited type 1 leprosy reactions mimicking the immune reconstitution inflammatory syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 44 (12), 4616–4618, 2006.

USTIANOWSKI, A.P.; LAWN, S.D.; LOCKWOOD, D.N. Interactions between HIV infection and leprosy: a paradox. *Lancet Infect.Dis*, v. 6, p. 350-360, 2006.

VAN BEERS, S. M. et al. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J of Leprosy and Other Mycob Dis* 62: 1-9, 1994.

VAN BEERS, S.; HATTA, M.; KLATSER, P. R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 67, n. 3, p. 243-249, 1999.

VAN DER BROEK, J. et al. Association between leprosy and HIV infection in Tanzania. *Int. J. Leprosy*, v. 65, n. 2, p. 203-210, 1997.

VIJAYAKUMARAN P. Does MDT arrest transmission of leprosy to household contacts? *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 66, n. 2, p. 125-30, 1998.

VINAY, K. et al. Human immunodeficiency virus and leprosy coinfection in Pune, India. *J. Clin. Microbiol.* 47(9), 2998–2999, 2009.

VISCO-COMANDINI, U. et al. Tuberculoid leprosy in a patient with AIDS: a manifestation of immune restoration syndrome. *Scand. J. Infect. Dis.* 36(11–12), 881–883, 2004.

WHO(a). Global leprosy: update on the 2012 situation. World Health Organization. *Wkly Epidemiol Rec.* 2013; 88(35):365-380. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/en/>. Acesso em: fevereiro de 2015.

WHO(b). Global health observatory 2011. World Health Organization [Internet]. [acesso 2011 Jul 11]. Disponível em: <http://www.who.int/gho/en/> [Links]

WILLIAMS, B. G.; DYE C. Antiretroviral drugs for tuberculosis control in the era of HIV/AIDS. *Science*, 301: 1535–37, 2003

WU, Q.; YE, G.; LI, X. Serological activity of natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in sera from patients with leprosy, tuberculosis and normal controls. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, v. 56, n. 1, p. 50-55, 1988.

YOUNG, D. B. et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*, v. 43, p. 183-188, 1984.

9 ANEXOS

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1) TÍTULO DAS PESQUISAS: Importância do contato com hanseniano e Síndrome de Reconstituição Imunológica em pacientes HIV positivos.

2) PESQUISADOR: Brunela Pitanga Ramos Madureira

3) COORDENADOR DA PESQUISA: Patrícia D. Deps

4) DIREITOS: Este termo de consentimento informará sobre o estudo o qual você está sendo convidado a participar.

Antes de tomar conhecimento de qualquer coisa, é importante que você saiba que sua participação é inteiramente voluntária. Você pode decidir não participar deste estudo, sem que nenhum prejuízo decorra desta decisão.

A informação obtida a partir deste estudo será publicada, porém a sua identidade será mantida em sigilo todas às vezes, bem como em qualquer publicação futura que vier a resultar deste estudo.

5) JUSTIFICATIVA: Este estudo destina-se ao conhecimento das doenças dermatológicas mais freqüentes entre as pessoas infectadas pelo HIV. Uma segunda parte do estudo, verifica a freqüência de infecção pelo agente causador da hanseníase através de aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais naqueles pacientes que relatarem contato com hansenianos.

Os conhecimentos originados deste estudo podem trazer aplicações diretas na atuação das equipes do Programa de Controle da Hanseníase e da HIV/AIDS a respeito dos casos diagnosticados com problemas dermatológicos e hanseníase.

6) OBJETIVOS:

- Identificar as características clínica e epidemiológica das doenças cutâneas em pacientes infectados com HIV.
- Descrever as características clínicas da hanseníase em pacientes infectados pelo HIV.
- Conhecer o grau de contato entre os pacientes infectados pelo HIV e hansenianos.
- Conhecer a produção de anticorpos anti-PGL-1 nos pacientes infectados pelo HIV que tiveram contato com hansenianos.

7) PROCEDIMENTOS: Preenchimento de questionário formulado especialmente para essa pesquisa; exame dermatológico das lesões cutâneas, coleta de soro nos pacientes que relatarem contato com hansenianos, e nos pacientes com lesões suspeitas de hanseníase, serão realizadas biopsia e baciloscopia.

8) DESCONFORTO E/OU RISCOS ESPERADOS: Não haverá nenhum desconforto adicional aos pacientes que seja imputado à pesquisa naqueles pacientes que não apresentarem lesões cutâneas ou quem não relatar contato com hansenianos. Entretanto, nos pacientes portadores de lesões suspeitas de hanseníase, a coleta de sangue e biopsia; e baciloscopia nos casos confirmados histologicamente de hanseníase. Os pacientes serão acompanhados pelos pesquisadores durante o

tratamento. Serão seguidas todas as normas exigidas pela Comissão de Ética para Pesquisas em seres humanos.

9) BENEFÍCIOS: Vigília constante dos aspectos clínicos dermatológicos implicados no diagnóstico da lesão cutânea, inclusive durante o tratamento da hanseníase.

10) INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Os pacientes ou responsáveis têm a garantia de que qualquer dúvida relacionada à pesquisa será prontamente esclarecida nas Unidades de Saúde onde estarão em tratamento ou diretamente com o pesquisador no Ambulatório de Pesquisa Clínica em Dermatologia no HUCAM.

11) RETIRADA DO CONSENTIMENTO: Uma vez aceito para participação no estudo, o paciente poderá não mais participar a qualquer momento, por vontade própria, bastando comunicar aos pesquisadores responsáveis, sem penalização alguma ou prejuízo ao seu cuidado ou atendimento de rotina.

13) CONSENTIMENTO:

Eu, _____, portador da
CI _____, e certifico que conhecendo as informações sobre a
pesquisa, estou de acordo e autorizo a minha participação bem como a utilização
destes dados e matérias coletados em publicações científicas da área de Saúde.

Data: _____

Assinatura: _____

Pesquisador ou Médico Assistente: _____

ANEXO B - ARTIGO DA TESE

PGL-I antibodies levels in HIV-infected individuals in a leprosy endemic area

Brunela Pitanga Ramos Madureira¹; Fernanda Marques de Carvalho²; Maria Cristina Vidal Pessolani²; Narjara Tiburtino Aloquio¹; Nadja Noujain Baptista¹; Thais Ferreira de Castilho¹ and Patricia Duarte Deps¹

¹ Department of Social Medicine, Federal University of Espírito Santo, Vitória, ES, Brazil.

² Laboratory of Cellular Microbiology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* Corresponding author

E-mail: pdeps@uol.com.br (PDD)

Authors contributions: Conceived and designed the experiments: BPRM, PDD. Acquisition of data: BPRM, FMC, MCVP, NTA, NNB, TFC. Performed the experiments: BPRM, FMC, MCVP. Analyzed the data: BPRM, FMC, MCVP, NTA, NNB, TFC, PDD. Contributed reagents/materials/ analysis tools: BPRM, FMC, MCVP. Wrote the article: BPRM, PDD. Wrote the paper: BPRM, PDD. Revised the manuscript critically: FMC, MCVP.

Abstract

The present study investigated subclinical *Mycobacterium leprae* infection in human immunodeficiency virus infected or uninfected individuals by measuring antibodies against *M. leprae* phenolic glycolipid I. It also sought to establish whether the serology results correlated with the HIV-infected participants' state of immunosuppression. This was a cross-sectional study that analysed the anti-PGL-I IgM antibody levels in 350 HIV-infected and 350 non-HIV-infected individuals. The possible

correlation between the state of immunosuppression of the HIV-infected participants (CD4+ cell count, viral load and the use or not of antiretroviral therapy) and anti-PGL-I seropositivity was assessed. The chi-square test for proportions was used to compare the proportion of PGL-I positivity between the groups. The non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the metric variables between the groups, as the assumption of normality required for the use of parametric tests was rejected. The significance level was set at 5% (0.05). Multivariate analysis was performed using the Hosmer-Lemeshow test for logistic regression. Approximately 6% (21/350) of the HIV-infected participants and 29.1% (102/350) of the non-HIV-infected were anti-PGL-I antibody seropositive. The number of anti-PGL-I antibody seropositive individuals was approximately five-fold higher in the non-HIV-infected group, compared with the HIV-infected group. There was no significant correlation between the state of immunosuppression of the HIV-infected participants and the anti-PGL-1 serology results. The measurement of anti-PGL-I IgM antibodies exhibits 80–100% sensitivity among multibacillary cases but only 14–40% sensitivity among paucibacillary cases. This was methodological limitation. The HIV-infected individuals exhibited less anti-PGL-I antibody production relative to the control group, which may indicate a lower rate of subclinical *M. leprae* infection and/or lower specific production of this antibody. B cell dysregulation might cause the low anti-PGL-I antibody production in HIV-infected individuals. The patients' state of immunosuppression did not correlate with the anti-PGL-I serology results.

Key-words: leprosy, HIV, coinfection, subclinical infection, anti-PGL-I, *Mycobacterium leprae*

Introduction

Human immunodeficiency virus (HIV) infection directly affects CD4+ receptor-expressing T cells and the progression of HIV infection results in the progressive depletion of these immune cells, which reduces the organism's ability to combat opportunistic diseases such as tuberculosis [1]-[2]. Some studies have shown that the risk of disease is 20-fold higher among HIV-seropositive individuals with latent *Mycobacterium tuberculosis* infection relative to HIV-seronegative individuals[1]. A greater risk of disease or manifestation of the most severe forms of leprosy would also

be expected, given the biological similarities between *M. tuberculosis* and *M. leprae*. This hypothesis was seemingly confirmed in an animal model, as rhesus macaques simultaneously infected with *M. leprae* and simian immunodeficiency virus (SIV) developed lepromatous leprosy [3]-[6]. However, epidemiological studies did not find an increased risk of disease or development of the most severe form of disease among HIV-seropositive individuals [7]-[14].

In contrast to latent tuberculosis, for which the tuberculin skin test and QUANTIFERON®-TB Gold (Qiagen, Venlo, Netherlands) are available [15], the only effective immunologic tool with which to assess *M. leprae* infection is a serology test to detect antibodies against phenolic glycolipid I (PGL-I) [16]-[20]. Investigation of anti-PGL-I in the contact persons of individuals diagnosed with leprosy allows the detection of seropositive cases that might be at a higher risk of disease and consequently achieves better monitoring and reduces the transmission of disease. In addition, this test may serve to estimate the magnitude of leprosy in a given area [21]-[26]

Although several studies on anti-PGL-I antibody seroprevalence have been conducted in countries endemic for leprosy as well as in non-endemic countries [26]-[43], the anti-PGL-I antibody seroprevalence among HIV-infected individuals has not yet been duly estimated. This situation is mainly due to the long incubation period and low incidence of leprosy. The only studies conducted in this regard assessed the HIV infection seroprevalence only among individuals with leprosy, whereas others made comparisons to a control group without leprosy [13]. These studies found wide variations in the rate of HIV infection among individuals with leprosy (0.3-33%) and most did not find significant differences in the HIV infection seroprevalence between cases and controls [8]-[11], [14], [44]-[50]. However, the results of these studies should be analysed cautiously, as the studies differed in design and inclusion criteria and the methods used were not described in full detail. In 1993 a different approach was applied by Gonzalez-Abreu et al. in Cuba [51]. Those authors investigated the *M. leprae* infection seroprevalence among HIV-infected individuals and found a greater percentage of anti-PGL-I positive cases among the HIV-infected individuals than among the non-infected ones. However, the cut-off point selected for the technique was 0.16 and the study was conducted before the advent of highly active antiretroviral therapy (HAART).

In 2004 Dr Ben Naafs et al. conducted a study with the same purpose in Tanzania (personal communication) but never published the results. Those authors used an

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the presence of anti-PGL-I antibodies to assess the occurrence of subclinical *M. leprae* infection in a group of HIV-infected individuals who had not been subjected to antiretroviral therapy (ART) and a group of non-HIV-infected individuals. In contrast to Gonzalez-Abreu *et al.*, Naafs *et al.* found that the number of individuals with a positive anti-PGL-I antibody test was much lower among the cases with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) when compared with healthy controls. According to those authors, a possible explanation for this finding involves the assumption that HIV-infected individuals with immunodeficiency do not respond normally to contact with other antigens.

Given the controversial results of the two studies mentioned above, we sought to investigate whether subclinical *M. leprae* infection is truly more frequent among HIV-infected individuals and whether there is an association between the serology results and the state of immunosuppression (CD4+ count, viral load, use or not of HAART).

Materials and methods

Study design

The present study was a cross-sectional study that analysed the serum anti-PGL-I levels, as determined via ELISA, of a group of 350 HIV-infected individuals and a group of 350 non-HIV infected individuals.

Study population, setting and duration

The study population comprised two groups: a group of individuals with HIV infection and a control group composed of individuals without HIV infection. All participants resided in the Great Vitória Metropolitan region (GVMR) and were age range- and gender-matched.

The study was conducted over an 18-month period from August 2010 to February 2012 at the Outpatient Dermatology and AIDS Research Clinic, Cassiano Antônio de Moraes University Hospital (Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes; HUCAM). HUCAM is located in the municipality of Vitória and is considered the largest public hospital in the state of Espírito Santo, Brazil, based on the number and high complexity of cases. Most patients treated at HUCAM reside in the GVMR, which

includes the municipalities of Vitória, Vila Velha, Viana, Serra, Guarapari and Cariacica. The incidence rates of leprosy and AIDS corresponding to the GVMR, Espírito Santo and Brazil are described in Table 1 for the purpose of epidemiological contextualisation.

Data collection

HIV-positive individuals were invited to participate in the study upon visiting the HIV/AIDS and Dermatology Clinical Research Services or the HUCAM Laboratory to collect blood samples for assessments of their CD4+ cell counts and viral loads. Approximately 85.6% of this group was using HAART at the time of recruitment, according to the recommendations for ART in HIV-infected adults formulated by the Brazilian Health Ministry [52]. The control group (no HIV infection) was randomly selected while performing routine blood sample collections requested by other HUCAM services.

Inclusion criteria

The group of cases included individuals from both genders who were older than 18 years of age; these participants had confirmed HIV/AIDS diagnoses by means of ELISA and western blotting and included those at any stage of disease who resided in the GVMR, regardless of ART use.

The control group also comprised individuals residing in the GVMR who were age- and gender-matched to participants in the group of cases and had been subjected to the HIV Rapid Check (immunochromatographic) test.

Laboratory procedures

Anti-PGL-I determination by ELISA

The ELISA immunoenzymatic screening test was conducted at the Leprosy Laboratory of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) to detect anti-PGL-I IgM antibodies. Peripheral blood samples were collected in vacutainer tubes without heparin, incubated at room temperature and processed to obtain serum. The obtained serum was aliquoted and stored at -20°C until use.

To quantify the anti-PGL-I IgM antibodies, NO-D-BSA (antigen) was absorbed by microplate wells at a concentration of 0.25 µl/mL for 24 hours. After this period, the

wells were washed with phosphate-buffered saline containing 0.3% Tween (PBS/T) and blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS/T for one hour at 37°C. The wells were again washed and serum samples diluted 1:100 in PBS/1% BSA were added to the plate. Following a one-hour incubation period, the wells were again washed and a peroxidase-conjugated anti-human IgM antibody (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA) was added to the wells. Following a one-hour incubation at 37°C, the wells were again washed and treated with the substrate 3,3',5,5'- tetramethylbenzidine (Sigma). The reaction was interrupted by adding 50 µL of 2.5 N sulphuric acid, and the colorimetric intensity was determined at 450 nm using a microplate reader. All sera were tested in duplicate, and the results obtained via ELISA were expressed as an average of the two absorption values. The cut-off point for positivity was an optical density value (OD) of 0.25. Individuals with an OD between 0.25 and 0.4 were considered weakly positive.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 19.0 (SPSS 19.0) for Windows 2000 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The chi-square test for proportions was used to compare the proportion of PGL-I positivity between the groups. The non-parametric Mann–Whitney test was used to compare the metric variables between the groups, as the assumption of normality required for the use of parametric tests was rejected. The significance level was set at 5% (0.05).

Cross tabulation summarizes categorical data to create a contingency table. Cross tabulation and chi-square test were used to analyse categorical data. They provide a picture of the interrelation between two variables. When the p-value is significant (< 0.050) the hypothesis must be rejected, it means, there is correlation between the tested variables. Multivariate analysis/ logistic regression was performed using the Hosmer-Lemeshow test (Table S1).

Ethical issues

This study was approved by the research ethics committee of the Centre of Health Sciences, Federal University of Espírito Santo (Universidade Federal do Espírito Santo; UFES), record no. 029/07 and conforms to the Declaration of Helsinki. All data

analyzed were anonymized. Participation was voluntary, and participants signed an informed consent form.

Results

The study population comprised 350 HIV-seropositive individuals (cases) and 350 HIV-seronegative individuals (controls); all participants resided in the GVMR. Only 21 participants (6%) in the group of cases exhibited positive anti-PGL-I serology versus 102 (29.1%) in the control group (Table 1); this difference was statistically significant ($p < 0.05$). The number of individuals in the control group with positive anti-PGL-I immunoglobulin (Ig) M serology was five-fold higher than that from the group of cases, and this difference was statistically significant ($p < 0.05$; Table 2).

The serum anti-PGL-I IgM antibody levels of all individuals in the present study are depicted in Figure 1. Although heterogeneity was present in the responses, a difference in the response level was observed between the groups.

Among the 21 participants positive for both HIV and anti-PGL-I antibodies, 81% were using HAART, 85.7% had a CD4+ cell count > 350 , and 71.4% had an undetectable viral load. Positive anti-PGL-I antibody serology was more frequent among men ($p < 0.05$). The anti-PGL-I antibody positive and negative individuals did not differ significantly with respect to the variables of CD4+ cell count, viral load, and use or not of HAART (Table 2). The distribution of these 21 participants across the GVMR was uniform; each participant resided in a different neighbourhood and no two belonged to the same family. Only one of these individuals had been diagnosed with leprosy (dimorphic tuberculoid) and had finished treatment by the time of blood sample collection.

Discussion

The frequency of mycobacterial infections has increased since the onset of the HIV epidemic. Surprisingly, this trend was not detected in most studies that investigated HIV and leprosy co-infection in the 1990s [7]-[14]. This association changed following the introduction of antiretroviral therapy (HAART). Several studies about co-infection described leprosy as an immune reconstitution syndrome [53]-[63]. According to some

authors, the prevalence of leprosy increased among HIV-infected individuals [62], [64]-[65].

To investigate the rate of subclinical *M. leprae* infection among HIV-infected individuals, we used the most widely employed and standardised resource: the measurement of anti-PGL-I IgM antibodies. The measurement of anti-PGL-I IgM antibodies exhibits 98% specificity and 80–100% sensitivity among multibacillary cases but only 14–40% sensitivity among paucibacillary cases [17]. This methodological limitation may have interfered not only with our results but also with those of previous studies conducted with the same purpose. According to this method, the rates of anti-PGL-I antibody seropositivity were 6% in the group of HIV-infected participants and 29.1% in the control group (without HIV infection); in other words, five-fold more frequent in the latter relative to the former.

Our results disagree with those reported from a study conducted in Cuba by Gonzalez-Abreu *et al.* (1993), who found a higher proportion of anti-PGL-I-positive individuals in a group of HIV-infected individuals relative to the control group [51]. Those authors measured the anti-PGL-I antibody levels in three groups: the HIV-infected group, in which 14.8% (65/437) of the individuals were anti-PGL-I-positive; the blood donor group (assumed to be non-HIV-infected), in which 1.27% (4/313) were anti-PGL-I-positive and the group representing the overall population, in which 3.02% (423/13,970) were anti-PGL-I-positive [51]. Another divergence from our study concerns the proportion of cases that exhibited an OD > 0.4, which was 10-fold higher in the group of HIV-infected individuals relative to the control group in the Gonzalez-Abreu *et al.* study but eight-fold higher in the control group in our study.

Anti-PGL-I serology as a tool for *M. leprae* infection diagnosis in healthy individuals has been used in serological surveys [22]-[23], [66] as well as in studies of the contacts of leprosy patients and healthy controls [67],[11]. Some studies have found that in endemic areas, anti-PGL-I seropositivity varied as a function of the local disease prevalence, indicating the ability of this test to demonstrate the exposure level of a given population to *M. leprae* in addition to confirming that subclinical infection is more common than actual disease [22]-[25].

The rate of anti-PGL-I seropositivity found in the control group (non-HIV-infected), at 29.1%, was higher than the rates reported by most studies conducted in endemic, highly endemic and hyper-endemic areas [26]-[43]. This finding cannot be

overlooked, given that *M. leprae* does circulate in the investigated area and that asymptomatic individuals participate in the chain of transmission, thus favouring the exposure of susceptible individuals.

The fact that in our study the anti-PGL-I seropositivity rate corresponding to HIV-infected individuals was only 6% is quite intriguing, given that we matched the groups (HIV-infected or not) according to geographic area, age and gender. Based on the results of our study, we conclude that the immune response against *M. leprae* antigens was poor in the HIV-infected individuals, most likely because of B cell dysregulation. Although serological tests are routinely used in to investigate co-infection in HIV-infected individuals, some reports indicate that the results of serology tests for diseases such as toxoplasmosis and deep mycoses are dubious in these cases because of deficient production of antibodies against the corresponding microorganisms[68]-[70]. Therefore, the HIV-infected and non-HIV-infected individuals in our study who were anti-PGL-I seropositive but asymptomatic may be contributing to the circulation of *M. leprae* in the environment. This hypothesis is supported by the fact that the control group, which assumedly has normal antibody production, exhibited strong anti-PGL-I positivity (OD > 0.4) and that this response was 8.4-fold more frequent in the control group than in the HIV-infected group.

Among the 21 HIV-infected individuals in our study with positive anti-PGL-I serology, 81% were using HAART, 85.7% had CD4+ cell counts > 350, and 71.4% had undetectable viral loads. However, when using these variables to investigate a possible correlation between the immunosuppression state and anti-PGL-I serology results, we did not find significant differences (Table 2). We expected that under HAART, anti-PGL-I antibody production would increase consequent to immune reconstitution, leading to a new recognition of the PGL-I antigen or the improvement of a latent recognition system; however, this was not the case. As known, in chronic HIV infection the regulatory T cell numbers are increased, and these cells are recognised as suppressors of antigen-specific CD4+ and CD8+ cell responses and controllers of pathogen-induced inappropriate or exaggerated immune activation [71]-[72]. Following HAART activity, the CD8+ cell population increases together with antibody production, indicating T cell activation. Suppressor CD8+ cells produce interleukin 4, which favours antibody production. For these reasons, the results of our study are paradoxical.

Some studies indicate that the combined investigation of *M. leprae* in the nasal mucosa by means of polymerase chain reaction (PCR) and the measurement of anti-PGL-I antibodies represents a satisfactory method with which to detect subclinical leprosy [73]. In fact, we had initially planned to collect nasal mucosa samples to investigate the presence of *M. leprae* via PCR-based DNA amplification. However, we could not perform this test because of the participants' lack of adherence upon being contacted. Nevertheless, we believe that the impossibility of performing this test does not compromise the results described herein. The reason is that the eventual detection of *M. leprae* in the nasal swab sample of an individual would not necessarily have indicated infection but the mere transport of bacilli, and the individual may have been only a passive vector. In addition, the sensitivity of the nucleic acid amplification-based *M. leprae* detection techniques is low [74]-[79]. On those grounds, it is not possible to assert with full certainty that the PCR-based test is a determinant of the performance of studies aimed at detecting subclinical leprosy [80]-[82].

In conclusion, our study found reduced anti-PGL-I antibody production in HIV-infected individuals, which may indicate a lower rate of subclinical *M. leprae* infection and/or lower specific production of these antibodies. B cell dysregulation may be the cause of the low anti-PGL-I antibody production in HIV-infected individuals. The immunosuppression state in these patients did not correlate with the anti-PGL-I serology results.

Acknowledgments

Fernando José de Souza and all of those who assisted at the Clinical Analysis Laboratory at HUCAM and Professor Rodrigo Ribeiro Rodrigues for supplying the "HIV Rapid Check".

References

1. Reid A, Scano F, Haileyesus G, Williams B, Dye C et al. (2006) Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, end support: the role of tuberculosis/HIV collaboration. *Lancet Infect* 6: 483-495.

2. Godfrey-Faussett P, Maher D, Mukadi YD, Nunn P, Perriens J, et al. (2002) How human immunodeficiency virus voluntary testing can contribute to tuberculosis control. *Bulletin of the World Health Organization* 80: 939-945.
3. Gormus BJ, Murphey-Corb M, Martin LN, Zhang JY, Baskin GB, et al. (1989) Interactions between simian immunodeficiency virus and *Mycobacterium leprae* in experimentally inoculated rhesus monkeys. *J Infect Dis*, 760:405-413.
4. Baskin GB, Gormus B J, Martin LN, Murphey-Corb M, Walsh GP, et al. (1990) Pathology of dual *Mycobacterium leprae* and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *Int J Lepr*; 58(2):358-364
5. Gormus, B. J. (1994) HIV infection and leprosy. *Int. J. Leprosy*; 62: 610-611.
6. Gormus BJ, Murphey-Corb M, Martin LN, Baskin GB, Mack PA, et al. (1998) Impaired responses to *Mycobacterium leprae* antigens in rhesus monkeys experimentally inoculated with simian immunodeficiency virus and *M. leprae*. *Lepr Rev*. 69: 24-39.
7. Pönnighaus JM, Mwanjasi LJ, Fine PE, Shaw MA, Turner AC, et al. (1991) Is HIV infection a risk factor for leprosy? *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 59 (2): 221-228
8. Sekar B, Jayasheela M, Chattopadhyaya D, Anandan D, Rathinavel L, et al. (1994) Prevalence of HIV infection and high-risk characteristics among leprosy patients of south India; a case-control study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 62 (4): 527-531.
9. Andrade VL, Alves TM, Avelleira JCR, Bayona M. (1997) Incidence of HIV-1 in leprosy patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Leprol* 10:159-163.
10. Lienhardt C, Kamate B, Jamet P, Tounkara A, Faye OC, et al. (1996) Effect of HIV infection on leprosy: a three years survey in Bamako, Mali. *Int J Leprosy* 64: 383-391.
11. Machado P, David Y, Pedroso C, Brites C, Barral A, et al. (1998). Leprosy and HIV infection in Bahia, Brazil. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 66 (2): 227-229.
12. Naafs B (2004). Algumas observações realizadas em 2003. *Hansen Int* 29 (1): 51-54
13. Ustianowski AP, Lawn SD, Lockwood DN (2006) Interactions between HIV infection and leprosy: a paradox. *Lancet Infect Dis* 6: 350- 360.
15. Dockrell HM, Geluk A, Brennan P, Saunderson PR, Oskam L, et al. (2011) Report on the sixth meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held in Beijing, China on 23-25 August 2010. *Lepr Rev* 82: 80-85.

14. Deps PD, Gripp CG, Madureira BP & Lucas EA (2008). Immune reconstitution syndrome associated with leprosy: two cases. *Int J STD AIDS* 19 (2):135-136
15. Dockrell HM, Geluk A, Brennan P, Saunderson PR, Oskam L, et al. (2011) Report on the sixth meeting of the IDEAL (Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy) consortium held in Beijing, China on 23-25 August 2010. *Lepr Rev* 82: 80-85.
16. Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT, Balagon MV, et al (2001) Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clinical Diagnostic Lab Immunology*. 8 (1): 138-142.
17. Oskam L, Slim E, Buhner-Sekula S (2003) Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 74: 196–205.
18. Martins AC, Miranda A, Oliveira ML, Buhner-Sekula S, Martinez A (2010). Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol*. 76 (5): 579-587.
19. Duthie MS, Hay MN, Rada EM, Convit J, Ito L, et al. (2011) Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30(10):1257-1265
20. Lobato J, Costa MP, Reis EM, Gonçalves MA, Spencer JS, et al. (2011) Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev* 82 (4): 389-401.
21. Bührer-Sekula S. (2008) Sorologia PGL-I na hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 41(2): 3-5.
22. Bagshawe AF, Garsia RJ, Baumgart K, Astbury L (1990) IgM serum antibodies to phenolic glycolipid-I and clinical leprosy: two years' observation in a community with hyperendemic leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 58 (1): 25-30.
23. Baumgart KW, Britton WJ, Mullins RJ, Basten A, Barnetson RS (1993) Subclinical infection with *Mycobacterium leprae* – a problem for leprosy control strategies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 87(4): 412-415.
24. Pönnighaus JM, Fine PE, Sterne JA, Bliss L, Wilson RJ, et al.(1994) Incidence rates of leprosy in Karonga District, northern Malawi: patterns by age, sex, BCG status and classification. 62(1):10-23.

25. Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH (2006) Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis* 193: 346-353.
26. Barreto JG, Guimarães LS, Frade MAC, Rosa PS, Salgado CG (2012) High rates of undiagnosed leprosy and subclinical infection amongst school children in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107 (1): 60-67.
27. Fine PE, Ponnighaus JM, Burgess P, Clarkson JA, Drapper CC (1998) Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 56: 243-254.
28. Cartel JL, Chanteau S, Boutin JP, Plichart R, Richez P, et al. (1990) Assessment of anti-phenolic glycolipid-I IgM levels using an ELISA for detection of *M. leprae* infection in populations of the South Pacific Islands. *Int J of Lepr and Other Mycob Dis* 58: 512-517.
29. Groenen G, Pattyn SR, Ghys P, Tshilumba K, Kuykens L, et al. (1990) A longitudinal study of the incidence of leprosy in a hyperendemic area in Zaire, with special reference to PGL-antibody results. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases* 58: 641-650.
30. Douglas JT, Steven LM, Hirsch DS, Fujiwara T, Nelson KE, et al. (1992) Evaluation of four semi-synthetic *Mycobacterium leprae* antigens with sera from healthy populations in endemic and non-endemic areas. *Lepr Rev* 63: 199-210
31. Cellona RV, Walsh GP, Fajardo TT, Abalos RM, dela Cruz EC, et al. (1993). Cross-sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu, The Philippines. *Int J of Lep and Other Mycob Dis* 61: 192-198.
32. van Beers SM, Izumi S, Madjid B, Maeda Y, Day R, et al. (1994) An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J of Leprosy and Other Mycob Dis* 62: 1-9.
33. Gonzalez-Abreu E, Pon JA, Hernadez P, Rodrigues J, Mendoza E et al. (1996) Serological reactivity to a synthetic analog of phenolic glycolipid I and early detection of leprosy in an area of low endemicity. *Leprosy Review* 67: 4-12.

34. van Beers S, Hatta M, Klatser PR (1999) Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-I among school children as an indicator of leprosy endemicity. *Annals Academy of Medicine Singapore* 67: 243-249.
35. Brasil MTLRF, Oliveira LR, Melo CS, Nakamura PM, Rimoli NS, et al. (1998) Aplicação do teste ELISA anti-PGL-1 em localidade com alta endemicidade de hanseníase, na região norte do estado de São Paulo. *Hansen. Int.* 23 (2): 35-38.
36. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Faber WR, van Beers SM, et al. (2004) Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. *Int J Epidemiol* 33: 1329-1336.
37. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, van Mosseveld P, Faber WR, et al. (2006) Risk factors for developing leprosy: a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev.* 77(1):48-61.
38. Bühner-Sékula S, van Beers S, Oskam L, Lecco R, Madeira ES, et al. (2008) The relation between seroprevalence of antibodies against phenolic glycolipid-I among school children and leprosy endemicity in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41 (2):81-88.
39. Silva RC, Lyon S, Araos R, Lyon AC, Grossi MAF et al. (2008) Comportamento dos testes sorológicos ML Flow e ELISA (PGL-I) em áreas endêmica e não endêmica de hanseníase. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:19-22.
40. Frota CC, Freitas MV, Foss NT, Lima LN, Rodrigues LC, et al. (2010) Seropositivity to anti-phenolic glycolipid-I in leprosy cases, contacts and no known contacts of leprosy in an endemic and a non-endemic area in northeast Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104(7):490-495.
41. Barreto JG, Guimarães LS, Leão MR, Ferreira DV, Lima RA, et al. (2011) Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Lepr Rev* 82: 358-370.
42. Stefani MM, Grassi AB, Sampaio LH, Sousa AL, Costa MB et al. (2012). Comparison of two rapid tests for anti- phenolic glycolipid- I serology in Brazil and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 124-131.
43. Hungria EM, Oliveira RM, Souza AL, Costa MB, Souza VN, et al. (2012) Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. *Mem Inst Osw Cruz* 107 (1)104-111.

44. Leonard G, Sangare A, Verdier M, Sassou-Guesseau E, Petit G, et al. (1990) Prevalence of HIV infection among patients with leprosy in African countries and Yemen. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(11):1109-1113.
45. Tekle-Haimanot R, Frommel D, Tadesse T, Verdier M, Abebe M, et al. (1991) A survey of HTLV-1 and HIVs in Ethiopian leprosy patients. *AIDS* 5 (1): 108-110.
46. Frommel D, Tekle-Haimanot R, Verdier M, Negesse Y, Bulto T, et al. (1994) HIV infection and leprosy: a four-year survey in Ethiopia. *Lancet* 344:165-166.
47. Gebre S, Saunderson P, Messele T, Byass P (2000) The effect of HIV status on the clinical picture of leprosy: a prospective study in Ethiopia. *Lepr Rev* 71(3):338-343.
48. Hussain T, Kulshreshtha K, Ghei SK, Natarajan M, Katoch A, et al. (2000) HIV seroprevalence in leprosy patients. *Int J Lepr* 68 (1): 67-69.
49. Moses AE, Adelowo KA, Ajayi BB (2003) Prevalence of HIV-1 infection among patients with leprosy and pulmonary tuberculosis in a semiarid region, Nigeria. *J R Soc Health* 123: 117-119.
50. Hussain T, Sinha S, Kulshreshtha KK (2005) Seroprevalence of HIV infection among leprosy patients in Agra, India: trends and perspective. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 73 (2):93-99.
51. Gonzalez-Abreu E, Rodriguez ME, Pérez J, Rodrigues J, Gonzalez A (1993) PGL-I antibody in HIV infected patients. *Lepr Rev* 64 (3): 275-276.
52. Ministério da Saúde (2013) Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em adultos.
53. Landay AL, Bettendorf D, Chan E, Spritzler J, Schmitz JL, et al. (2002) Evidence of immune reconstitution in anti-retroviral drug-experienced patients with advanced HIV disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18 (2), 95–102.
54. Lawn SD, Wood C, Lockwood DN (2003) Borderline tuberculoid leprosy: an immune reconstitution phenomenon in a human immunodeficiency virus-infected person. *Clin Infect Dis* 36 (1), e5–e6.
55. Visco-Comandini U, Longo B, Cuzzi T et al. (2004). Tuberculoid leprosy in a patient with AIDS: a manifestation of immune restoration syndrome. *Scand. J. Infect. Dis.* 36(11–12), 881–883.

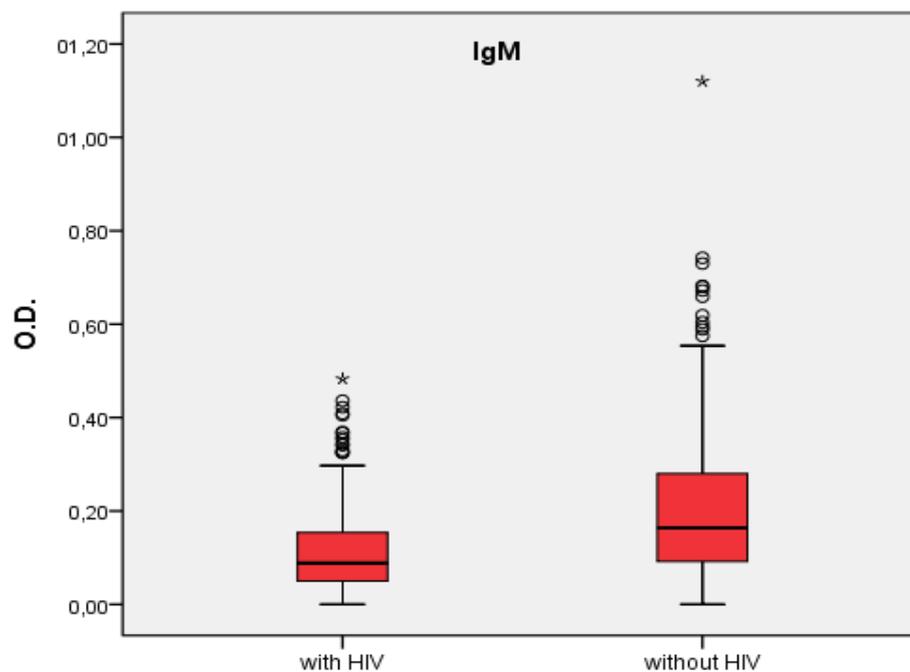
56. Couppié P, Abel S, Voinchet H, Roussel M, Hélénon R, et al. (2004) Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with HIV and leprosy. *Arch. Dermatol.* 140(8): 997–1000.
57. Trindade MA, Valente NY, Manini MI, Takahashi MD, Anjos CF, et al. (2006) Two patients coinfecting with *Mycobacterium leprae* and human immunodeficiency virus type 1 and naive for antiretroviral therapy who exhibited type 1 leprosy reactions mimicking the immune reconstitution inflammatory syndrome. *J. Clin. Microbiol.* 44 (12), 4616–4618.
58. Kharkar V, Bhor UH, Mahajan S, Khopkar U (2007) Type I lepra reaction presenting as immune reconstitution inflammatory syndrome. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 73(4): 253–256.
59. Martiniuk F, Rao SD, Rea TH, Glickman MS, Giovinazzo J, et al. (2007) Leprosy as immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV-positive persons. *Emerg Infect Dis* 13(9): 1438-1440.
60. Batista MD, Porro AM, Maeda SM, Gomes EE, Yoshioka MC, et al.(2008) Leprosy reversal reaction as immune reconstitution inflammatory syndrome in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 46:e56–60.
61. Menezes VM, Sales AM, Illarramendi X, Miranda A, Gonçalves MM, et al.(2009) Leprosy reaction as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome: a case series of a Brazilian cohort. *AIDS* 23(6), 641–643.
62. Talhari C, Mira MT, Massone C, Braga A, Chrusciak-Talhari A, et al. (2010) Leprosy and HIV coinfection: a clinical, pathological, immunological, and therapeutic study of a cohort from a Brazilian referral center for infectious diseases. *J Infect Dis* 202(3), 345–354.
63. Deps P, Lucas S, Porro AM, Maeda SM, Tomimori J, et al. (2013) Clinical and histological features of leprosy and human immunodeficiency virus co-infection in Brazil. *Clinical and Experimental Dermatology* 38(5): 470-477.
64. Couppié P, Domergue V, Clyti E, El Guedj M, Vaz T, et al. (2009) Increased incidence of leprosy following HAART initiation: a manifestation of the immune reconstitution disease. *AIDS* 23(12), 1599–1600.
65. Vinay K, Smita J, Nikhil G, Neeta G (2009) Human immunodeficiency virus and leprosy coinfection in Pune, India. *J. Clin. Microbiol.* 47(9), 2998–2999.

66. van der Broek J, Chum HJ, Swai R, O'Brien RJ (1997) Association between leprosy and HIV infection in Tanzania. *Int J Leprosy other Mycobact Dis* 65 (2): 203-210.
67. Vijayakumaran P, Jesudasan K, Mozhi NM, Samuel JD (1998) Does MDT arrest transmission of leprosy to household contacts? *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 66: 125-130.
68. Singh S, Singh N, Maniar JK (1996) AIDS associated toxoplasmosis in India and its correlation with serum tumour necrosis factor-alpha. *J Paras Dis* 20(Supp 1):49-52.
69. Bhaskar R (2005) Seronegative central nervous system toxoplasmosis in HIV/AIDS. *J Intern Med* 5 (2): 9.
70. Morejón KML, Machado AA, Martinez R (2009) Paracoccidioidomycosis in patients infected with and not infected with human immunodeficiency virus: a case control study. *Am J Trop Med Hyg* 80:359–366.
71. Belkaid Y & Rouse BT. (2005) Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology* 6: 353-60.
72. Raghavan S & Holmgren J (2005) CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam 44: 121–127
73. Goulart IM & Goulart LR (2008). Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res.* 300(6):269-90.
74. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M (2001) PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol* 50(2):177-182.
75. Jadhav RS, Macdonald M, Bjune G, Oskam L (2001) Simplified PCR detection method for nasal *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 69 (4): 299-307
76. Torres P, Camarena JJ, Gomez JR, Nogueira JM, Gimeno V, et al. (2003) Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev* 74 (1): 18-30.
77. Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, et al. (2004) Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(5): 509-511.
78. Bang PD, Suzuki K, Phuong le T, Chu TM, Ishii N, et al. (2009) Evaluation of polymerase chain reaction-based detection of *Mycobacterium leprae* for the diagnosis of leprosy. *J Dermatol* 36(5):269-276.

79. Banerjee S, Sarkar K, Gupta S, Mahapatra PS, Gupta S, et al. (2010) Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts--a pilot study from India. *BMC Infect Dis.* 10:252.
80. Pattyn SR, Ursi D, Ieven M, Grillone S, Raes V (1993). Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr* 61: 389-393.
81. De Wit MYL, Douglas JT, Mcfadden J, Klatser PR (1993) Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microb* 31: 502-506.
82. Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, et al. (2005) Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 44(3):311-6.

Figure legends

Figure 1. OD distribution according to the groups.



Legend. OD: optical density; HIV: human immunodeficiency virus

Supporting Information

Table S1. Logistic regression

Patient characteristics	Multivariate analysis		
	p-value	OR adjusted	IC 95%
Gender			
Male	0.006	4.070	1.494-11.087
Female		1.000	-
Age (years)			
20-39	0.117	2.166	0.825-5.691
≥40 anos		1,000	-
Treatment			
HAART	0.151	0.358	0.088-1.454
No HAART		1.000	-
CD4⁺ cell count			
>500		1,000	-
350-500	0.619	1.362	0.403-4.605
<350	0.351	0.510	0.124-2.097
Viral load			
Undetectable	0.283	1.906	0.587-6.185
Detectable		1.000	-

*Homer-Lemeshow test = 0,328 the model fit the data well

Tables

Table 1. Anti-PGL-1 antibodies in HIV positive and HIV negative

Serology PGL-1	Groups				p-value
	HIV positive		HIV negative		
	N	%	n	%	
Negative	329	94	248	70.9	0.000
Weak positive	16	4.6	60	17.1	0.000
Strong positive	5	1.4	42	12	0.000
Total	350	100	350	100	-

Table 2. Characteristics of HIV infected individuals

Patient characteristics	HIV positive individuals				p-value
	Serology PGL-I Negative		Serology PGL-I Positive		
	N	%	N	%	
Treatment					
HAART	297	90,3	17	81,0	0,322
No HAART	32	9,7	4	19,0	0,322
CD4+ cell count					
>500	193	58,7	14	66,7	0,621
350-500	58	17,6	4	19,0	0,895
<350	78	23,7	3	14,3	0,469
Viral load					
Undetectable	205	62,3	15	71,4	0,546
Detectable	124	37,7	6	28,6	0,546
Gender					
Male	124	37,7	13	61,9	0,049
Female	205	62,3	8	38,1	0,049
Age (years)					
20-39	112	34,0	10	47,6	0,302
40-59	186	56,5	11	52,4	0,888
≥60	31	9,4	0	0,0	0,264
Total	329	100	21	100	-