

Pesquisa de anticorpos anti PGL-I através de ELISA em tatus selvagens do Brasil

Research regarding anti-PGL-I antibodies by ELISA in wild armadillos from Brazil

Patrícia D. Deps^{1,2}, João Marcelo A.P. Antunes¹, Carlos Faria³, Samira Bühner-Sékula⁴, Zoilo P. Camargo⁵, Diltor V. Opromola⁶ e Jane Tomimori⁷

RESUMO

Tatus têm sido envolvidos na transmissão da hanseníase e considerados como fonte de *Mycobacterium leprae* em muitas publicações. Médicos de partes dos EUA consideram o contato com tatus um fator de risco para hanseníase. Entretanto, há um desafio associado ao papel do tatu na perpetuação da hanseníase no Continente Americano. Foi pesquisada a presença de anticorpos anti-PGL-I em tatus selvagens de áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Espírito Santo, Brasil, através de ELISA realizado em amostras de soro de 47 animais. ELISA positivo foi encontrado em 5 (10.6%) tatus. Tatus infectados podem ter algum papel na transmissão da hanseníase disseminando bacilos no meio ambiente, talvez tornando mais difícil a interrupção da cadeia de transmissão e redução do número de casos novos de hanseníase. A técnica de ELISA é um eficiente método para investigação soroepidemiológica da presença do *Mycobacterium leprae* em tatus.

Palavras-chaves: *Mycobacterium leprae*. Hanseníase. Tatu. ELISA. PGL-I.

ABSTRACT

Armadillos have been involved in leprosy transmission and are considered a source of *Mycobacterium leprae* in numerous reports. Clinicians from certain areas of the USA consider contact with armadillos a risk factor for leprosy. However, there is a challenge associated with the role of wild armadillos perpetuating human leprosy in the American Continent. The presence of anti-PGL-I antibodies was investigated in wild nine-banded armadillos from leprosy-endemic areas in State of Espírito Santo, Brazil, by ELISA performed on serum samples from 47 armadillos. Positive ELISA was obtained from 5 (10.6%) armadillos. Infected armadillos may play some role in leprosy transmission, disseminating bacilli in the environment, perhaps making it more difficult to interrupt transmission and reduce the number of new leprosy cases. ELISA is an efficient tool for seroepidemiological investigations of *Mycobacterium leprae* in armadillos.

Key-words: *Mycobacterium leprae*. Leprosy. Armadillos. ELISA. PGL-I.

Apesar da hanseníase ter diminuído em todos os países endêmicos, no Brasil o número anual de casos novos tem mantido quase o mesmo nos últimos 5 anos²⁹. O Estado do Espírito Santo está localizado na Região Sudeste do Brasil e é classificado como de alta prevalência para a hanseníase¹⁸.

A transmissão da hanseníase e fontes do *Mycobacterium leprae* tem sido assunto de muitos manuscritos, mas a transmissão a partir de pacientes multibacilares não tratados para indivíduos

susceptíveis é considerada, pela maioria dos hansenologistas, como a única forma possível de adquirir a hanseníase.

Tatus selvagens do centro-sul dos Estados Unidos da América (EUA) albergam uma infecção natural pelo *Mycobacterium leprae*²⁵ e naquela região médicos consideram o contato com tatus um fator de risco para hanseníase¹⁷. Entretanto, há um desafio associado com o papel dos tatus selvagens ajudando a perpetuar a hanseníase em seres humanos neste Hemisfério. Além dos EUA^{26,27,28}, infecção pelo *Mycobacterium leprae* em tatus selvagens tem sido relatado no México¹, Argentina¹⁵, e no Brasil^{5,6,7,8}.

Há controvérsias se os tatus são fontes de *Mycobacterium leprae* e se contribuem para a transmissão da hanseníase no Brasil^{5,6,7,8}.

Atualmente, os tatus são considerados importantes como modelo experimental de infecção pelo *Mycobacterium leprae*, e a principal fonte de bacilos utilizados na pesquisa da hanseníase para pesquisa e finalidades diagnósticas²⁴. Em tatus experimentalmente infectados, a infecção pelo *Mycobacterium leprae* pode ser detectada pela técnica de PCR^{12,5}, autópsia^{12,28}, sorologia usando ELISA²³, teste do fluxo lateral (ML Flow)⁷, e histopatologia^{12,28}.

Glicolípido fenólico-1 (PGL-I) é um antígeno altamente específico do *Mycobacterium leprae*¹⁰, e é conhecido por

1. Departamento de Medicina Social, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES, Brasil. 2. Departamento de Infectologia e Doenças Tropicais, London School of Hygiene & Tropical Medicine, Londres. 3. Departamento de Patologia, Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia, Vitória, ES, Brasil. 4. KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. 5. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 6. Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil. 7. Departamento de Dermatologia, Universidade Federal De São Paulo, São Paulo, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Patrícia Duarte Deps. Centro de Ciências da Saúde/Departamento de Medicina Social/ UFES. Av. Marechal Campos 1468, Maruípe, 29040-090 Vitória-ES, Brasil.

Tel: 55 27 3335-7210; Fax: 55 27 3335-7226

e-mails: pdeps@uol.com.br; patricia.deps@lshtm.ac.uk

umentar a produção, predominantemente, anticorpos IgM contra o trissacarídeo terminal. Tatus multibacilares têm uma forte resposta com a produção de anticorpos contra o *Mycobacterium leprae*. Em animais experimentalmente infectados, o momento da detecção dos anticorpos está altamente correlacionado com a carga bacteriana nos tecidos dos animais e eles persistem por todo curso da doença^{20,23}. A maioria dos animais experimentalmente infectados desenvolve infecção generalizada com aproximadamente 10¹² bacilos que podem ser encontrados principalmente no fígado e baço num período de 18-24^{13,24} meses após a inoculação.

Este artigo é referente ao nosso primeiro estudo que foi realizado na área rural do Estado do Espírito Santo, Brasil, onde ainda muitos tatus de nove-bandas (chamados de *tatu galinha* ou *tatu peba*) têm sido capturados, abatidos e consumidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Quarenta e sete tatus (nove-bandas) selvagens, da espécie *Dasybus novemcinctus* foram investigados a procura de infecção natural pelo *Mycobacterium leprae*. Os animais foram capturados por um biotécnico na área rural do Estado do Espírito Santo, localizado na região Sudeste do Brasil no período de 2001-2002. Os tatus foram transportados da área rural para o cativeiro localizado na Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de Vitória. Após, eles foram cuidados por 3-4 dias e então eles foram submetidos a anestesia com uma mistura de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepan (Ketamine[®] and Zoletil[®]). Sexo e peso foram anotados, e um completo exame físico foi feito na pele, nariz, orelhas, patas procurando por lesões, e os linfonodos foram palpados procurando por linfadenopatias. O sangue foi coletado através de punção intracardíaca ou femoral, e após a centrifugação, o soro foi separado e estocado a -20°C para testes sorológicos.

ELISA para detecção de anticorpos IgM contra o PGL-I do *Mycobacterium leprae* foi realizado basicamente como descrito anteriormente³ usando NT-P-BSA como análogo semi-sintético do PGL-I. NT-P-BSA (0.0023 µg de açúcar/ml) foi diluído em tampão volátil de acetato de amônia carbonado (pH 8.2). Foi usado 0.1µg/ml de albumina de soro bovino (BSA) como controle. Em resumo, as placas de ELISA foram bloqueadas por 60 minutos com 100µl de BSA 1% (m/v) em PBS. Antes do uso, as placas foram lavadas 4 vezes com PBST, e foram adicionados 100µl de solução bloqueadora PBS 1% (m/v) BSA por poço. Após uma hora de incubação a 37°C, foram adicionadas 50µl por poço de amostra diluída a 1:100 em PBST contendo 10% (V/V) de soro normal de cabrito (NGS). Em todas as placas foram usados soro padrão, controles positivo e negativo, e as amostras foram testadas em duplicata. Após 1 hora de incubação, os poços foram lavados 4 vezes. Anti-IgM humana conjugada a peroxidase (Cappel/Organon Teknika[®], Turnhout, Belgium) diluída a 1:10000 em PBST 10% NGS foi adicionado (50µl por poço). Após uma hora de incubação a 37°C o procedimento de lavagem foi repetido e 50µl do substrato líquido Sigma 3,3',5,5'- tetramethyl-benzidine (TMB) foi adicionado a cada poço. Após incubação por 15

minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, as reações colorimétricas foram paradas adicionando 50µl de 0.5M ácido sulfúrico e realizada leitura em densidade ótica (DO) de 450nm quando o soro padrão atingisse um valor de 0.6. O valor de cut-off para positividade foi uma DO de 0.200.

Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (Brasil) e tem licença do IBAMA para captura e coleta de materiais em animais selvagens, número 018/2001.

RESULTADOS

Tatus foram capturados na área rural em 6 diferentes cidades do Estado do Espírito Santo: Cariacica (Hospital Colônia Pedro Fontes), Guarapari, Muniz Freire, Serra (Reserva Ambiental da CST) e Vila-Velha.

Apesar de 66 tatus terem sido capturados, amostras de sangue foram coletadas apenas de 47 tatus, os quais foram incluídos na análise sorológica. O peso variou de 350 a 5200gr, 24 eram machos (51%). Dentre os achados clínicos inespecíficos foi evidenciada a presença de nódulos e úlceras em 17 (36%) animais.

ELISA foi realizado em soro de 47 animais e anticorpos anti PGL-I foram detectados em 5 (10,6%). A média dos valores de absorbância do soro de cada ELISA está apresentada na **Figura 1**. Entre os 5 animais com ELISA positivos, 4 apresentaram úlceras e/ou nódulos (**Tabela 1**). Escoriações nas orelhas, nariz e patas estavam presentes em 42 animais. Linfonodos inguinais estavam aumentados em ambos os lados de um animal.

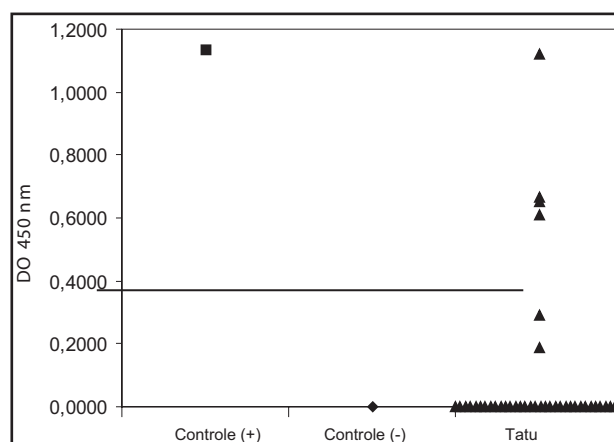


FIGURA 1

Distribuição dos níveis de anticorpos anti-PGL-I pela técnica de ELISA em tatus e controles humanos negativo e positivo.

TABELA 1

Animais positivos, e correlação clínica com os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I.

Animal nº	DO	Lesões clínicas	Aumento dos linfonodos
F002	0.611	Úlceras	Não
F005	1.121	Úlceras	Sim (inguinal)
F007	0.667	Úlceras	Não
M017	0.650	Úlceras	Não
M020	0.289	Não	Não

F: fêmea, M: macho, DO: densidade óptica.

DISCUSSÃO

Achados clínicos da infecção pelo *Mycobacterium leprae* em tatus não são freqüentes. A hanseníase em tatus se manifesta de forma similar a forma virchowiana da doença nos seres humanos. Entretanto, aproximadamente apenas 5% dos tatus naturalmente infectados desenvolvem sinais clínicos como linfadenomegalia, nódulos cutâneos e tumorações no exame físico ou aumento dos linfonodos e hepatoesplenomegalia na necropsia. Bacilos são encontrados na maioria das vísceras dos tatus²⁸.

Neste estudo, o único animal em que os linfonodos foram palpáveis, também tinha o maior nível de anticorpos anti PGL-I (animal F005), os outros 3 animais (F002, F007, M017) apresentaram lesões clínicas (úlceras).

A freqüência de positividade em anticorpos neste estudo foi de 10,6%, percentual menor do que quando foi utilizado o teste do ML Flow (29,7%)⁷ em animais da mesma área, e também menor do que o encontrado no estudo com tatus da Louisiana e Texas (16%)²². Entretanto, no presente estudo, alguma destruição de antígenos pode ter ocorrido durante o transporte do soro congelado de Vitória para São Paulo.

Anos depois da primeira demonstração de que tatus de novebandas (*tatu-galinha*) poderiam ser infectados experimentalmente pelo *Mycobacterium leprae*¹⁴, foi encontrado também que tatus selvagens de partes do Sudeste dos EUA poderiam também carrear a infecção natural. O sorodiagnóstico através da detecção de anticorpos anti PGL-I em tatus foi possível a partir da descoberta da reação cruzada entre a IgM dos tatus e a humana^{20,21}, e reação cruzada destas IgM com outras proteínas dos tatus não foram detectadas com o conjugado peroxidase-anti IgM humana. O sorodiagnóstico tem sido usado para detecção de infecção experimental em tatus utilizados em pesquisa. Entretanto, a sorologia também pode ser uma importante ferramenta em estudos epidemiológicos para detecção de infecção pelo *Mycobacterium leprae* em tatus selvagens^{7, 9, 22}.

Antígenos PGL-I são altamente específicos do *M. leprae*² e resultados falso-positivos causados por uma resposta de anticorpos não específica de tatus a infecção por micobactérias atípicas não são relatados²⁴.

Detecção de IgM anti PGL-I pelo ELISA em pacientes MB varia de 85% a 100%, e em pacientes PB de 5% a 34%^{4, 11, 16}. Estas diferenças entre as duas formas polares ocorrem porque a forma virchowiana (MB) apresenta deterioração da imunidade celular, uma alta carga antigênica e alto níveis de anticorpos, e a forma tuberculóide (PB) apresenta parâmetros de imunidade celular

intactos, raros bacilos e pouca ou nenhuma elevação dos níveis de anticorpos. Este aspecto particular da hanseníase em duas formas polares faz com que a sorologia seja principalmente designada para o diagnóstico das formas MB¹⁹.

Hanseníase PB em tatus pode significar infecção subclínica uma vez que poucos animais desenvolveram sinais clínicos de hanseníase, e quando o fazem são consideradas da forma virchowiana (MB). Interpretações de ELISA positivo e negativo foram baseados em estudo de absorção, alcançando sensibilidade de 89% e aparente especificidade de 100% para detecção da infecção pelo *Mycobacterium leprae* tanto em seres humanos quanto em tatus.

Hanseníase em tatus selvagens é considerada de transmissão zoonótica e o risco relativo para humanos dependeria de variações de fatores do hospedeiro e probabilidade de indivíduos susceptíveis terem alguma interface com tatus infectados^{8, 22}. Ainda, outras espécies de tatus além do *Dasyopus novemcinctus* não foram analisadas, apesar de existirem várias outras espécies descritas no Estado do Espírito Santo.

Mais estudos deveriam ser desenhados com a finalidade de estudar o relacionamento entre hanseníase e tatus selvagens no Brasil, principalmente em áreas endêmicas para hanseníase. Tatus infectados pelo *Mycobacterium leprae* poderiam disseminar os bacilos no meio ambiente, tornando mais difícil a interrupção da cadeia de transmissão da hanseníase e a eliminação da doença no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Este estudo teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (401026/2005-1), American Leprosy Missions e a Fundação de Apoio à Ciência e a Tecnologia do Espírito Santo-FAPES-FUNCITEC (31181570/2005). O autor JMAPA recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES.

APOIO FINANCEIRO

Este estudo teve o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq (401026/2005-1), American Leprosy Missions e a Fundação de Apoio à Ciência e a Tecnologia do Espírito Santo-FAPES-FUNCITEC (31181570/2005). O autor JMAPA recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES.

REFERÊNCIAS

1. Amezcua ME, Escobar-Gutierrez A, Storrs EE, Dhople AM, Burchfield HP. Wild Mexican armadillo with leprosy-like infection (letter). *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 52: 254, 1984.
2. Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 48: 382-387, 1980.

3. Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R. Use of Synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. *Clinical and Experimental Immunology* 64: 476-483, 1986.
4. Cellona RV, Walsh GP, Fajardo TT, Abalos JR, Dela RM, Cruz EC, Guido-Villa-Hermosa L, Felicio-Ballagon MV, Steenberg GJ, Douglas JT. Cross-sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semi-synthetic antigen natural disaccharide octyl bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu, The Philippines. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 61: 192-198, 1993.
5. Deps PD, Santos AR, Tomimori-Yamashita J. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood sample from nine-banded armadillo: preliminary results (letter). *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 70: 34-35, 2002.
6. Deps PD. Research of *Mycobacterium leprae* in wild armadillos (*Dasybus novemcinctus*) in the State of Espírito Santo State. Doctorate thesis, São Paulo Federal University, São Paulo, SP, 2003.
7. Deps PD, Antunes JMAP, Tomimori-Yamashita J. Detection of *Mycobacterium leprae* infection in wild nine-banded armadillos (*Dasybus novemcinctus*) using a rapid ML Flow test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 86-7, 2007.
8. Deps PD, Alves BL, Gripp CG, Aragão RL, Guedes B, Filho JB, Andreatta MK, Marcari RS, Prates I, Rodrigues LC. Contact with armadillos increases the risk of leprosy in Brazil: a case control study. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology* 74: 338-342, 2008.
9. Eggelte TA, Van Rens MM, De Wit MYL, Klatser PR. Use of synthetic antigens in the serodiagnosis of leprosy infection in armadillos. *Quaderni di cooperazione sanitaria – Health cooperation papers* 7: 65-72, 1988.
10. Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 147: 728-735, 1981.
11. Hussain R, Jamil S, Kifayet A, Firdausi F, Dockrell HM, Lucas S, Hasan R. Quantitation of IgM antibodies to the *M.leprae* synthetic disaccharide can predict early bacterial multiplication in leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 58: 491-502, 1990.
12. Job CK, Drain V, Williams DL, Gillis TP, Truman RW, Sanchez RM, Deming AT, Hastings RC. Comparison of polymerase chain reaction technique with other methods for detection of *Mycobacterium leprae* in tissues of wild nine-banded armadillos. *Leprosy Reviews* 62:362-373, 1991.
13. Job CK, Sanchez RM, Hastings RC. Manifestations of experimental leprosy in the armadillo. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34:151-61, 1985.
14. Kirchheimer WF. Experimental leprosy in the nine-banded armadillo. *Public Health Reports* 90: 483-485, 1975.
15. Martinez AR, Resoagli EH, De Millan SG, Resoagli JP, Ramirez MM, Cicuta ME, De Rott MIO, Sandoval A. Lepra salvaje en *D. novemcinctus* (Linneo 1758). *Archivos Argentinos de Dermatologia* 34: 21-30, 1984.
16. Roche PW, Briton WJ, Failbus SS, Ludwig H, Theuvenet WJ, Adiga RB. Heterogeneity of serological responses in paucibacillary leprosy: differential responses to protein and carbohydrate antigens and correlation with clinical parameters. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 58: 319-327, 1990.
17. Scollard DM, Joyce MP, Gillis TP. Development of leprosy and type 1 leprosy reactions after treatment with infliximab: a report of 2 cases. *Clinical Infectious Diseases*. 43: e19-22, 2006.
18. Secretaria de Saúde do Estado do Espírito Santo. Governo Estadual do Espírito Santo. Atividades de controle da hanseníase. Dados Epidemiológicos, 2006.
19. Torella A, Solis RL, Perez E, Medina Y, Kerguelen C, Olaya P. Anti *M. leprae* IgM antibody determination by ultramicroimmunoenzymatic (UMELISA HANSEN) for the diagnosis and monitoring leprosy. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 40: 177-181, 1998.
20. Truman RW, Morales MJ, Shannon EJ, Hastings RC. Evaluation of monitoring antibodies to PGL-I in armadillos experimentally infected with *M.leprae*. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 54: 556-559, 1986a.
21. Truman RW, Shannon EJ, Hagstad HV, Hugh-Jones ME, Wolff A, Hastings RC. Evaluation of the origin of *Mycobacterium leprae* infectious in the wild armadillo, *Dasybus novemcinctus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35: 588-593, 1986b.
22. Truman RW, Job CK, Hastings RC. Antibodies to the phenolic glycolipid-1 antigen for epidemiologic investigations of enzootic leprosy in armadillos (*Dasybus novemcinctus*). *Leprosy Reviews* 61: 19-24, 1990.
23. Truman RW, Kumaresan JA, McDonough MC, Job CK, Hastings RC. Seasonal and spatial trends in the detectability of leprosy in wild armadillos. *Epidemiology and Infection* 106: 549-560, 1991.
24. Truman RW, Sanchez RM. Armadillos: Models for leprosy. *Laboratory Animal* 22: 28-32, 1993.
25. Walsh GP, Storrs EE, Burchfield HP, Vidrine ME, Binford CH. Leprosy-like disease occurring naturally in armadillos. *Journal of the Reticuloendothelial Society* 18: 374-51, 1975.
26. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH, Gerome PJ, Wolf RH, Leininger JR. Leprosy – a zoonosis. *Leprosy Reviews* 52: 77-83, 1981.
27. Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. *Journal of Leucocyte Biology* 40: 645-656, 1986.
28. World Health Organization. Leprosy global situation, 2007. *Weekly Epidemiological Records* 82:225-232.