

Perfil serológico anti PGL I y anti LID-1 en pacientes paraguayos infectados con *Mycobacterium leprae* y contactos intradomiciliarios

Serological. anti PGL I and anti LID-1 profile in paraguayan patients infected with *Mycobacterium leprae* and household contacts

Gloria Maíz¹, Leticia Rojas¹, Laura Franco¹, José Pereira Brunelli², Olga María Almada Olmedo², Diego González¹, Vilma Figueredo³, Marcia de Berrêdo-Pinho³, Geraldo Pereira³, María Cristina Vidal Pessolani³ y Chyntia Carolina Díaz Acosta^{1,a}

¹Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-UNA.

²Programa Nacional de Control de Lepra-MSPyBS.

³Laboratorio de Microbiología Celular-IOC-FIOCRUZ.

^a<https://orcid.org/my-orcid?orcid=0000-0002-8541-8312>

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

El proyecto fue financiado por el CONACYT, a través del programa PROCIENCIA con recursos del Fondo para la Excelencia e Investigación – FEEI y donaciones de antígenos, anticuerpos e insumos por el Laboratorio de Microbiología Celular (LAMICEL) del Instituto Oswaldo Cruz (IOC) de la FIOCRUZ (Brasil).

Recibido: 4 de abril de 2024 (Segunda versión: 7 de noviembre de 2024) / Aceptado: 13 de diciembre de 2024

Resumen

Introducción: La Enfermedad de Hansen es crónica y puede ocasionar trastornos motores graves por ausencia de tratamiento o diagnóstico tardío. La prevalencia en Paraguay se mantiene igual hace décadas. La serorreactividad ante antígenos específicos de *Mycobacterium leprae* (PGL I y LID-1) puede indicar un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, especialmente en contactos. **Objetivo:** Evaluar el nivel de anticuerpos mediante una prueba de ELISA *in house* en diferentes poblaciones de interés. **Métodos:** estudio observacional descriptivo de corte transversal, donde se analizaron sueros de 28 pacientes al momento del diagnóstico y 22 contactos intradomicilio, que acudieron al Programa Nacional de Control de la Lepra de Paraguay durante 2018 al 2023. También fueron analizados sueros de 11 voluntarios sanos de nivel socioeconómico medio a elevado provenientes de zonas no endémicas. **Resultados:** La serorreactividad ante PGL I fue 89,5% y 66,6% en pacientes multibacilares (MB) y paucibacilares (PB) respectivamente. En contactos intradomicilio (HC) resultaron serorreactivos 40% de contactos de multibacilares (HCMB) y 42,9% de los paucibacilares (HCPB). En cuanto al LID-1, hubo serorreactividad de 78,9% en MB, 44,4% en PB y 16,6% en HCPB. Se observó correlación significativa ($p < 0,0001$) con el índice bacilosκόpio. Un tamizaje de sueros anonimizados de pacientes sin antecedentes clínicos de lepra ($n = 81$) ha detectado 12,3% positivos para PGL I; los mismos provenientes de la capital y departamentos circundantes. Un tamizaje de sueros de un banco de sangre ($n = 100$) de Asunción detectó una serorreactividad de 6,7% ante LID-1. **Conclusión:** La aplicación del ELISA *in house* puede beneficiar la vigilancia de la lepra en Paraguay.

Palabras clave: lepra; serorreactividad; PGL I; LID-1; ensayo de inmunoabsorción enzimática *in house*

Abstract

Background: Hansen's Disease is chronic and can cause severe motor disorders, due to lack of treatment or late diagnosis. The prevalence in Paraguay has remained the same for decades. Seroreactivity to specific antigens of *M. leprae* (PGL I and LID-1); may indicate an increased risk of developing the disease, especially in contacts. **Aim:** To evaluate the level of antibodies using an in-house ELISA test for different target populations. **Methods:** Descriptive observational cross-sectional study, in which sera from 28 patients at the time of diagnosis and 22 household contacts who attended the National Leprosy Control Program of Paraguay between 2018 and 2023 were analyzed. Additionally, sera from 11 healthy volunteers of middle to high socioeconomic status from non-endemic areas were also analyzed. **Results:** Seroreactivity to PGL I was 89.5% and 66.6% of multibacillary (MB) and paucibacillary (PB) patients, respectively. In household contacts (HC), 40% of multibacillary contacts (HCMB) and 42.9% of paucibacillary contacts (HCPB) were seroreactive. Regarding LID-1, 78.9% in MB, 44.4% in PB and 16.6% in HCPB. A significant correlation ($p < 0.0001$) was observed with the smear index. Screening of anonymized sera of patients without a clinical history of leprosy ($n = 81$) has detected 12.3% positivity for PGL I; all residents of the capital and surrounding departments. Screening of sera from a blood bank ($n = 100$) in Asunción detected a seroreactivity of 6.7% against LID-1. **Conclusion:** The use of the in house ELISA could benefit leprosy surveillance in Paraguay.

Keywords: leprosy; seroreactivity; PGL I; LID-1; in house enzyme-linked immunosorbent assay.

Correspondencia a:

Chyntia Carolina Díaz Acosta

cdiaz@iics.una.py; chyntiacarolinadiaz@gmail.com

Introducción

La enfermedad de Hansen es una infección granulomatosa crónica cuyo agente causal es *Mycobacterium leprae*, pudiendo avanzar a trastornos motores graves si los pacientes no reciben tratamiento o si reciben un diagnóstico tardío¹. La presentación clínica varía en un amplio espectro por lo cual el sistema de Ridley y Jopling la define en los siguientes tipos: lepra tuberculoide polar (LT), lepra tuberculoide *borderline* (BT), lepra *borderline-borderline* (BB), lepra *borderline*-lepromatosa (BL), y lepra lepromatosa polar (LL). También existen formas iniciales de la enfermedad llamadas indeterminadas (LI) que corresponde al inicio de la enfermedad². La Organización Mundial de la Salud (OMS) la clasifica en la forma paucibacilar (PB) asociada a una fuerte respuesta inmune celular, presencia de 1 a 5 lesiones cutáneas y baciloscopia negativa. La multibacilar (MB) asociada a una respuesta celular débil, se define por presentar al menos uno de los siguientes signos: más de cinco lesiones cutáneas; afectación de los nervios, o baciloscopia positiva, independientemente del número de lesiones cutáneas^{3,4}.

Esta enfermedad sigue presente en más de 120 países, registrándose más de 200.000 casos nuevos al año en todo el mundo⁵. En Paraguay la lepra se presenta de forma endémica, se han registrado 1.780 casos nuevos desde el año 2015 al 2019, con un promedio de 350 casos por año. En el 2001, el país logró su indicador de eliminación como un problema de salud pública (prevalencia < 1 caso por 10.000 habitantes), manteniendo esta condición hasta la actualidad; sin embargo, se han identificado casos nuevos cada año procedentes de todos los departamentos del país. El problema se acrecienta en ciertos departamentos que presentan más de 1 caso por 10.000 habitantes como ocurre en Ñemebucú, Presidente Hayes, Canindeyú y Alto Paraguay. Entre los casos detectados, aproximadamente 80% son MB y 20% son PB. Así también, se han registrado casos de lepra en niños bajo 15 años de edad, siendo un total de 49 casos en los años 2015 al 2019 y dos casos de niños con discapacidad de grado 1 (DG1) en los años 2018 y 2019. Estos datos indican que el patógeno sigue transmitiéndose de manera activa en nuestro país. La transmisión continua en áreas endémicas, probablemente se produce a partir del gran reservorio de individuos que están infectados de manera subclínica^{6,7}.

Así, la detección precoz de infección por *M. leprae*, seguida de intervenciones efectivas, se considera clave para interrumpir la transmisión. Actualmente, el diagnóstico en nuestro país se basa en un examen clínico junto con la evaluación microbiológica de frotis cutáneo (baciloscopia) e histopatología. No obstante, para interrumpir la transmisión es importante contar con herramientas adicionales que ayuden a la detección temprana de la

enfermedad. Los contactos intradomiciliarios presentan mayor riesgo de contraer la enfermedad, razón por la cual uno de los pilares de la estrategia 2016-2020 de la OMS para el control de la lepra ha sido el seguimiento de dichos contactos^{8,9}.

En la actualidad, no existe prueba de laboratorio alguna que por sí sola se considere suficiente para diagnosticar la lepra; sin embargo, se encuentran disponibles herramientas empleadas como auxiliares en el diagnóstico, tales como las pruebas serológicas que evalúan anticuerpos contra antígenos específicos de la superficie externa de *M. leprae* como el glicolípido fenólico I (PGL I) y una proteína quimérica de dos antígenos micobacterianos con reactividad serológica en pacientes, denominada *Leprosy IDRI diagnostic-1* (LID-1). La reactividad serológica ante ambos antígenos pueden indicar mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, especialmente en contactos de pacientes con lepra¹⁰⁻¹³. En ese contexto, el objetivo del presente estudio fue reportar los resultados de una prueba de ELISA *in house* que evaluó el nivel de anticuerpos anti PGL I y LID-1 en sueros de individuos paraguayos, obtenidos en el periodo de 2018 a 2021.

Pacientes y Métodos

Poblaciones de estudio

El diseño del estudio es observacional descriptivo de corte transversal. Fueron reclutados pacientes adultos diagnosticados en el Programa Nacional de Control de la Lepra (PNCL) y que hubieran aceptado participar del estudio firmando un consentimiento informado. La obtención de muestra de sangre fue realizada por profesionales del PNCL en el momento del diagnóstico de lepra (antes de iniciar el tratamiento), así como de los contactos intradomiciliarios (adultos o adolescentes) que acudieron al PNCL durante los años 2018 a 2023. Se obtuvieron sueros de 28 pacientes y 22 contactos intradomiciliarios. El diagnóstico fue realizado empleando la clasificación de Ridley y Jopling² para las formas clínicas de la lepra y para facilitar el tratamiento se realizó la clasificación de la OMS.

Criterio de inclusión

Pacientes recientemente diagnosticados con lepra y sus contactos intradomiciliarios (hasta 65 años de edad). Se incluyeron hasta dos contactos de consanguinidad por caso índice para garantizar un *background* genético variable.

Criterio de exclusión

Los pacientes no podían encontrarse en tratamiento con corticosteroides durante los últimos tres meses, no debían ser pacientes con infección por virus de la hepatitis B (VHB+) o presentar diabetes mellitus; además se excluyó a personas con infección por VIH.

También fueron estudiados sueros de 11 voluntarios sanos cuyos datos clínicos-laboratoriales de rutina fueron colectados y que hubieran provenido de zonas no endémicas, con estado socioeconómico medio a elevado según ficha epidemiológica. Para la selección de los voluntarios sanos se realizó un cuestionario que incluía requisitos; el incumplimiento de al menos un ítem dejaba como descalificado para su selección. Los requisitos consistieron en: hombre o mujer de nacionalidad paraguaya de 18 a 65 años, gozar de buena salud, no presentar cuadros alérgicos o febriles al momento de la obtención de muestra, no padecer enfermedades crónicas o inmunológicas, no padecer enfermedades infecciosas o inflamatorias, no padecer enfermedades hepáticas, no consumir antialérgicos o inmunosupresores, no haber viajado a zonas rurales donde pudo estar en contacto con animales silvestres como el armadillo. Por otro lado, fueron evaluados un total de 126 sueros anonimizados para la realización de pruebas de tamizaje. El tamizaje de anti PGL I ($n = 81$) se aplicó a sueros de individuos sin antecedentes clínicos de lepra, el tamizaje anti LID-1 ($n = 100$) se aplicó a sueros de un banco de sangre del área capitalina. Los sueros de banco de sangre no contaban con datos demográficos ni clínicos.

Detección de anticuerpos IgM anti PGL I

El ensayo de ELISA *in house* para detección de anticuerpos IgM anti PGL I en suero, fue realizado modificando el protocolo descrito por Richardus RA (2017)¹⁴. Para ello, placas de ELISA Nunc de 96 pocillos fueron sensibilizadas *overnight* a 4°C con ND-O-HSA (BEI Resources N° NR-19347), el cual es un glicoconjugado derivado del antígeno PGL I, empleando 500 ng del antígeno por pocillo en tampón carbonato/bicarbonato 0,1 M pH 9,6. Se procedió a un lavado con PBS-Tween20 a 0,3%. Los pocillos fueron bloqueados con tampón de bloqueo (PBS-Tween²⁰ 0,3% + BSA al 1%) durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente lavados. Sueros diluidos (1:200) de los sujetos de estudio fueron agregados (50 µL por pocillo) e incubados por una hora a 37°C. Posteriormente, los pocillos fueron lavados y se agregó el anticuerpo anti-IgM humano conjugado con peroxidasa en una dilución de 1:5.000 (Sigma), incubando por una hora a 37°C, luego del lavado se agregó 100 µL del sustrato TMB y se incubó por cuatro min, seguido de solución de H₂SO₄ 1N para detener la reacción. Las lecturas (OD) fueron realizadas a 450 nm/630 nm. Controles positivos (CP) y Controles negativos (CN) fueron incluidos en cada corrida. Las lecturas se normalizaron dividiéndolas por el OD del control negativo + 1 desvío estándar, obteniéndose la OD relativa.

Detección de anticuerpos anti LID-1

El ensayo de ELISA *in house* para detección de anticuerpos anti LID-1 se basa en el protocolo de Herwanto

y cols., 2019¹⁵. Placas de ELISA Nunc de 96 pocillos, fueron sensibilizadas *overnight* a 4°C con 100 µL del antígeno LID-1 de concentración 1 µg/mL diluido en tampón carbonato/bicarbonato 0,05M pH 9,6. Posterior al lavado (PBS-Tween20 a 0,3%) se adicionó 200 µL de tampón de bloqueo y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Luego del lavado se adicionó 50 µL de suero diluido 1:200 en PBS-T 0,3%+BSA 0,1% y se incubó por dos horas a temperatura ambiente. Se procedió al lavado y se adicionó anticuerpo IgG anti-humano conjugado con peroxidasa (Invitrogen ref.: A18805), en una dilución de 1:10.000 en solución PBS-T 0,3%+BSA 0,1% y se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se lavó y se adicionó 100 µL de sustrato TMB por pocillo. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 1N. Controles positivos (CP) y Controles negativos (CN) fueron incluidos en cada corrida. Las lecturas (OD) fueron realizadas a 450 nm/630 nm. Las lecturas se normalizaron dividiéndolas por el OD del control negativo + 1 desvío estándar, obteniéndose la OD relativa.

Determinación del punto de corte del ELISA

El punto de corte de la prueba de ELISA para el anticuerpo IgM anti PGL I e IgG anti LID-1, fue determinado con sueros ($n = 100$) de donantes sanos colectados en un banco de sangre de un hospital público. Controles positivos y negativos fueron proveídos gentilmente por el Laboratorio de Microbiología Celular del Instituto Oswaldo Cruz (Brazil). Controles positivos (CP) y Controles negativos (CN) fueron incluidos en cada corrida. CP1 = control positivo bajo; CP2, CP3, CP5, CP33 = controles positivos altos; CN1 y CN-R = controles negativos bajos; CN2, CN3 y CN4 = controles negativos altos. Los valores de densidad óptica (OD) de los donantes fueron normalizados usando la OD del control negativo bajo + 1 desvío estándar (SD), obteniéndose OD relativas. El punto de corte se estableció mediante el promedio de las OD relativas + el triple del SD. La zona gris (indeterminado) se estableció como la zona entre el punto de corte y el promedio de las OD relativas + el doble del SD. Posteriormente, los valores de OD relativa de los pacientes, contactos y voluntarios sanos fueron comparados con dicho punto de corte.

Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados utilizando el software GraphPad Prism v8.0.1. Fue empleada estadística descriptiva para las variables categóricas como las demográficas y clínicas, las variables cuantitativas fueron presentadas con media $\pm$ DS o mediana con rango intercuartílico dependiendo del comportamiento de la distribución de los datos. Para representar la proporción de individuos serorreactivos, variable categórica, se empleó frecuencia absoluta y relativa porcentual. En cuanto a los gráficos, se

emplearon gráficos de dispersión para la representación de las densidades ópticas (variable cuantitativa) obtenidas en las pruebas de ELISA para cada grupo de estudio. Así también se empleó análisis de correlación de Pearson para evaluar la relación existente entre la densidad óptica relativa y el índice bacilosκόpio, ambas variables cuantitativas. Para el análisis de la distribución normal de los datos fueron empleados los tests de Shapiro-Wilk para muestras con $n < 30$ y Kolmogorov-Smirnov para grupos con $n \geq 30$.

Consideraciones éticas

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Asunción (IICS-UNA), Paraguay con código P15/2018. Los participantes firmaron un consentimiento informado antes de proceder a la recolección de muestras y datos clínico-epidemiológicos.

Resultados

Caracterización de las poblaciones estudiadas

Fueron evaluados un total de 28 pacientes de los cuales 19 (68%) eran MB y 9 (32%) PB, siendo 13 (46%) de sexo femenino, con promedio de edad de 38 años; 15 (54%) eran hombres con un promedio de edad de 47 años (Tabla 1). Según la clasificación clínica (Ridley y Jopling), 13 pacientes eran LL, 6 BL, 4 LI, 3 BT y 2 LT. Como patología de base de la población reclutada solo

dos contaban con comorbilidades que correspondía a hipertensión arterial. Ningún otro paciente cursaba con otra comorbilidad aparente al momento del diagnóstico.

Por otro lado fueron evaluados 22 contactos intradomicilio (HC) de los casos índice reclutados, de los cuales 15 (68%) eran HCMB (contactos de pacientes MB) y 7 (32%) HCPB (contacto de pacientes PB), la mayoría (73%) de sexo femenino y un promedio de 34 años de edad. El 27% restante eran de sexo masculino, con un promedio de 44 años de edad (Tabla 1). Según la clasificación operacional, 10 eran contactos de pacientes LL, 5 de pacientes BL, 3 de pacientes LI, 2 de pacientes BT y 2 de pacientes LT.

Los voluntarios sanos ($n = 11$) se seleccionaron con una distribución de edad y sexo similar al grupo de pacientes y contactos (Tabla 1). En cuanto al Grupo de tamizaje (individuos que consultaron por otro motivos que no fuera sospecha clínica de lepra), se observó una distribución igualitaria de sexo, donde el sexo femenino presentó una mediana de edad de 35 años y el sexo masculino una mediana de 56 años (Tabla 1).

Evaluación de anticuerpos anti PGL I y anti LID-1 por ELISA in house

Inicialmente se determinaron los puntos de corte en cada prueba. Para el ELISA anti PGL I, se determinó la densidad óptica relativa de 100 donantes. Fueron utilizados controles positivos y negativos bajos y altos. El promedio se calculó en base a los resultados de 89 donantes, ya que 11 fueron considerados *outliers* por

Tabla 1. Caracterización demográfica y clínica de la población de estudio

Grupo	Sujetos	Sexo n (%)	Edad	Clasificación RJ n (%)	Clasificación operacional n (%)
Pacientes diagnosticados con lepra	28	F 13 (46%)	F 38 ± 14 ^A	LL 13 (46%)	MB 19 (68%)
		M 15 (54%)	M 47 ± 15 ^A	BL 6 (21%)	PB 9 (32%)
				LI 3 (11%)	
				BT 3 (11%)	
				LT 3 (11%)	
Contactos intradomicilio	22	F 16 (73%)	F 34 ± 14 ^A	LL 10 (45%)	HCMB 15 (68%)
		M 6 (27%)	M 44 ± 20 ^A	BL 5 (23%)	HCPB 7 (32%)
				LI 3 (14%)	
				BT 2 (9%)	
				LT 2 (9%)	
Grupo de voluntarios sanos	11	F 8 (73%)	F 33 ± 10 ^A	NA	NA
		M 3 (27%)	M 42 (41 - 43) ^B		
Grupo tamizaje PGL I	74	F 38 (51%)	F 35 (68-20) ^B	NA	NA
		M 36 (49%)	M 56 (67-29) ^B		

RJ: Ridley y Jopling. SD: Desviación estándar. HC: Household contact. MB: Multibacilar. PB: Paucibacilar. A: Media ± Desviación estándar. B: Mediana (Rango intercuar-tílico). NA: No aplica.

tener valores positivos (4/11 con OD relativa mayor a CP2 y 7/11 mayor a CP1). Para obtener la OD relativa, los valores se han normalizado con la OD media del CN + una desviación estándar (SD) de cada corrida. Para PGL I se utilizó CN2 como normalizador en cada corrida, para LID-1 se utilizó CN3. Una vez normalizadas las lecturas, se procedió a calcular el punto de corte (Tablas 2 y 3). El mismo se determinó a partir de OD media +3SD, siendo $\bar{X} + 3SD = 1,8609$ para PGL I (Figura 1A). Para el ELISA anti LID-1, el promedio de OD relativa de los donantes sanos fue $\bar{X} = 0,5267$ con una DS de 0,2667 dando un valor de punto de corte igual a 1,3268 (Tabla 3; Figura 1B). En el caso de LID-1 se eliminó un *outlier* cuyo valor era mayor al CP33. La zona gris se estableció como la zona entre el punto de corte y $\bar{X} + 2SD$. Para PGL I fue entre 1,4919 y 1,8609 (Figura 1A) y para LID-1 entre 1,0601 y 1,3268 (Figura 1B). Para resultados en la zona gris se recomendó un estudio de seguimiento aunque se considerara un resultado negativo.

Seguidamente, se procedió a la detección de anticuerpos IgM anti PGL I en sueros de pacientes con lepra, contactos intradomiciliarios, además de voluntarios sanos. Se observó serorreactividad en 23/28 pacientes con lepra (82,1%) y en 9/22 contactos intradomiciliarios (40,9%) (Tabla 4). En el grupo de pacientes, resultaron serorreactivos 17/19 pacientes MB (89,5%) y 6/9 pacientes PB (66,6%); en el grupo de contactos, 6/15 de los contactos MB (40,0%) y 3/7 de los contactos PB (42,9%) (Figura 2A). No se observó serorreactividad en los voluntarios sanos.

Por otro lado, se procedió a la detección de los anticuerpos IgG anti LID-1, observándose serorreactividad en 19/28 pacientes (67,8%) (Tabla 4). En contactos intradomiciliarios, 3/22 (13,6%) resultaron serorreactivos, los cuales eran HCPB. No se observó serorreactividad en contactos HCMB (Figura 2B).

La proporción de serorreactivos para ambos PGL I y LID-1 (16/28), se presenta en la Figura 3 donde se observa 16/19 (84%) de los pacientes MB como doble positivos.

Niveles de IgM anti PGL I e IgG anti LID-1 como indicadores de carga bacteriana

Se evaluó la relación del índice bacilosκόpio (IB) de los pacientes MB con respecto a la proporción de pacientes seropositivos (Tabla 5). Los IB fueron estratificados en cuatro grupos: 0 cruces, menor a 2 cruces (< 2+), de 2 a 4 cruces (2+ a 4+) y mayor a 4 cruces (> 4+). Se observó que a medida que aumentaba el IB, aumentaba la frecuencia de pacientes positivos para ambos anticuerpos IgM anti PGL I e IgG anti LID-1. Hubo 57% de positivos para ambos anticuerpos en pacientes con IB < 2+; y 100% en pacientes con IB de $\geq 2+$.

Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluaron las densidades ópticas relativas anti PGL I y LID-1, en función al índice bacteriológico (Figura 4) y se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa ($p < 0,0001$).

Tabla 2. Valores de densidad óptica relativa de los donantes sanos y controles positivos y negativos. ELISA anti PGL I

	Donantes	CP1	CP2	CN1	CN2
Media	0,7548	2,01	5,44	0,3542	0,9798
Desviación Std.	0,3687	0,1455	1,653	0,06784	0,02025
Error Std. De la media	0,04376	0,07276	0,8264	0,03392	0,01013

*CP1 = control positivo bajo; CP2 = control positivo alto; CN1 = control negativo bajo; CN2 = control negativo alto. Normalidad evaluada por el test de Shapiro-Wilk

Tabla 3. Valores de densidad óptica relativa de los donantes sanos y controles positivos y negativos. ELISA anti LID-1

	Donantes	CP3	CP5	CP33	CN-R	CN1	CN3	CN4	CN-15
Media	0,5267	2,9640	3,8770	3,0950	0,2109	0,5590	0,9961	1,2040	0,2691
Desviación estándar	0,2667	0,0086	0,1163	0,0353	0,0225	0,0026	0,0421	0,0053	0,0684
Error estándar de la media	0,02331	0,0060	0,0823	0,0249	0,0159	0,0019	0,0211	0,0037	0,0484

CN = control negativo, CP = control positivo, listados en materiales y métodos. Normalidad evaluada por el test de Shapiro-Wilk.

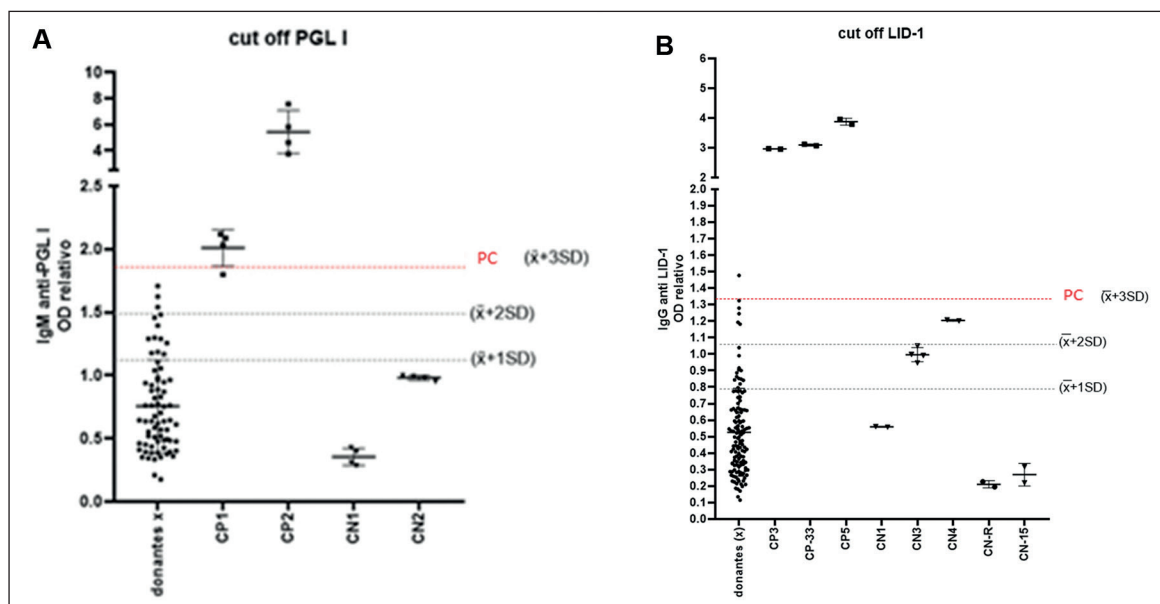


Figura 1. Determinación del punto de corte (CO) de las pruebas de ELISA anti PGL I y anti LID-1 en sueros de donantes sanos. Se muestran los valores relativos de OD 450 nm/630 nm de cada donante sano en **A)** ELISA anti PGL I y **B)** ELISA anti LID-1. Para ello los valores de OD se normalizaron con la OD del CN+1SD de cada corrida; para PGL I se usó CN2 y para LID-1 el CN3. Se indica la media (barra horizontal) con desviación estándar. El punto de corte (PC línea roja) para PGL I fue 1,8609 y para LID-1 fue 1,3268. Controles positivos (CP) y Controles negativos (CN) fueron incluidos en cada corrida. CP1 = control positivo bajo; CP2, CP3, CP33, CP5= controles positivos altos; CN1 y CN-R= controles negativos bajos; CN2, CN3 y CN4= controles negativos altos.

Aplicación de la prueba de ELISA anti PGL I en sueros anonimizados de individuos sin antecedentes clínicos de lepra (Grupo de tamizaje PGL I)

La prueba de ELISA anti PGL I fue aplicada en 81 muestras de sueros anonimizados, sin antecedentes clínicos de lepra, para evaluar serorreactividad contra PGL I. El 12,35% (10/81) de la población evaluada presentó serorreactividad positiva frente a este antígeno (Figura 5). La procedencia de los individuos serorreactivos era de los departamentos Central, Cordillera, San Pedro y de la capital Asunción.

Aplicación de la prueba de ELISA anti LID-1 en sueros anonimizados de Asunción (Grupo de tamizaje LID-1)

La prueba de ELISA anti LID-1 fue aplicada en 100 muestras de sueros de un banco de sangre de Asunción para evaluar serorreactividad contra LID-1. El 4,0% (4/100) de la población evaluada presentó serorreactividad positiva frente a este antígeno (Figura 6).

Discusión

La lepra es una enfermedad antigua que aún se considera endémica en algunos países a pesar de la disminución

Tabla 4. Proporciones de pacientes y contactos serorreactivos

Grupos	PGL I	LID-1
MB	17/19 (89,5%)	15/19 (78,9%)
PB	6/9 (66,6%)	4/9 (44,4%)
Total	23/28 (82,1%)	19/28 (67,8%)
HCMB	6/15 (40,0%)	0/15 (0%)
HCPB	3/7 (42,9%)	3/7 (42,9%)
Total	9/22 (40,9%)	3/22 (13,6%)

MB multibacilar, PB paucibacilar, HCMB contacto de multibacilar, HCPB contacto de paucibacilar.

de la prevalencia a nivel mundial¹⁶; Paraguay es uno de estos países, detectándose 1.780 casos nuevos en el periodo 2015 al 2019, con un promedio de 350 casos nuevos por año, inclusive en niños, lo cual indica que el patógeno *M. leprae* se transmite de manera activa en nuestro país¹⁷. En el periodo 2018-2020, un total de 222 pacientes asistieron al Programa Nacional de Control de Lepra (PNCL). El diagnóstico de lepra es un desafío, ya que no existen métodos laboratoriales estándar de oro para diferenciar entre infección y enfermedad, además de la variación en presentaciones clínicas. El diagnóstico de la lepra requiere la presencia de al menos una manifes-

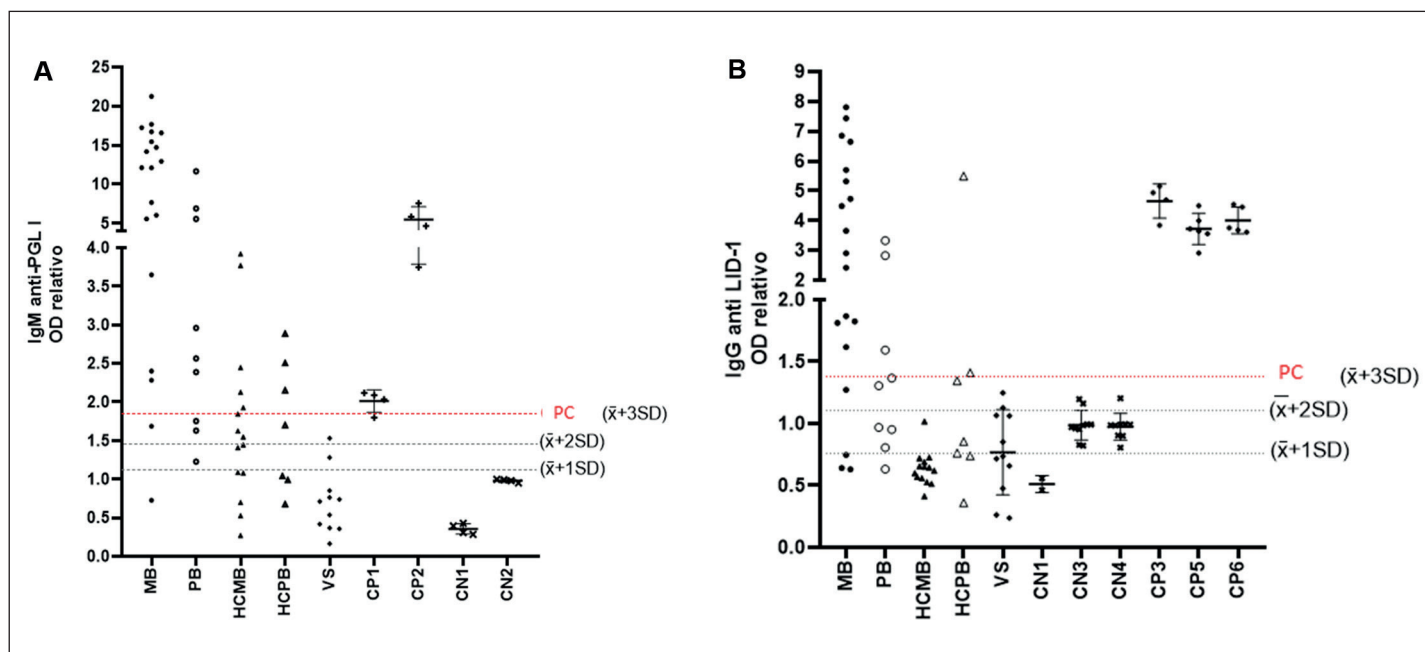


Figura 2. Nivel de anticuerpos anti PGL I y anti LID-1 en pacientes, contactos y voluntarios sanos. Representación gráfica de los valores de OD relativos obtenidos en sueros de MB (n= 19) y PB (n=09), HCMB (n=15), HCPB (n=7) y VS (n=11), ante A) el antígeno PGL I y B) el antígeno LID-1. Los niveles relativos de anticuerpos se calcularon normalizando la OD de cada muestra con respecto a la OD media + 1SD del CN (control negativo) de cada corrida de ELISA. El punto de corte (PC) se visualiza en rojo. MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, HCMB: contactos multibacilares, HCPB: contactos paucibacilares, VS: Voluntarios sanos.

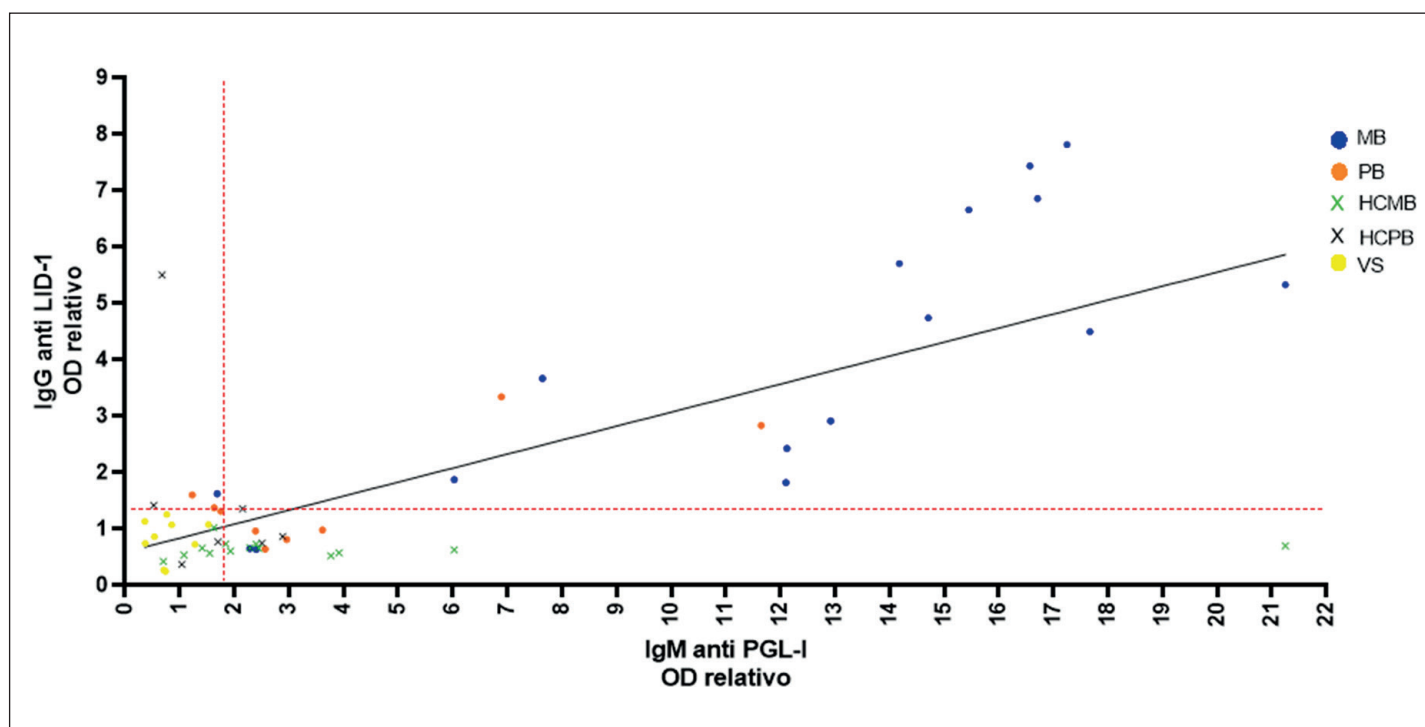


Figura 3. Perfil de anticuerpos anti PGL I y anti LID-1 en los grupos de estudio. Representación gráfica de las OD relativas de las pruebas de ELISA anti LID-1 en función a las obtenidas en PGL I. La línea discontinua roja indica el punto de corte de la prueba anti PGL I (1,86) y anti LID-1 (1,33). MB: pacientes multibacilares, PB: pacientes paucibacilares, HCMB: contactos multibacilares, HCPB: contactos paucibacilares, VS: Voluntarios Sanos.

Tabla 5. Proporciones y frecuencias de pacientes MB serorreactivos anti PGL I y anti LID-1 con respecto al IB

Grupo	IB	Número de muestras	PGL I	LID-1	PGL I y LID-1
MB	0	2	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/2 (0%)
	< 2 +	7	7/7 (100%)	5/7 (71%)	4/7 (57%)
	2+ a 4 +	8	8/8 (100%)	8/8 (100%)	8/8 (100%)
	> 4 +	1	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
Total		*18	17/18 (94%)	15/18 (83%)	13/18 (72%)

MB = multibacilar, IB = índice baciloscópico. Punto de corte de la prueba de ELISA para anti PGL I = 1,86 y para anti LID-1 = 1,33.

*Un paciente carecía de datos de IB.

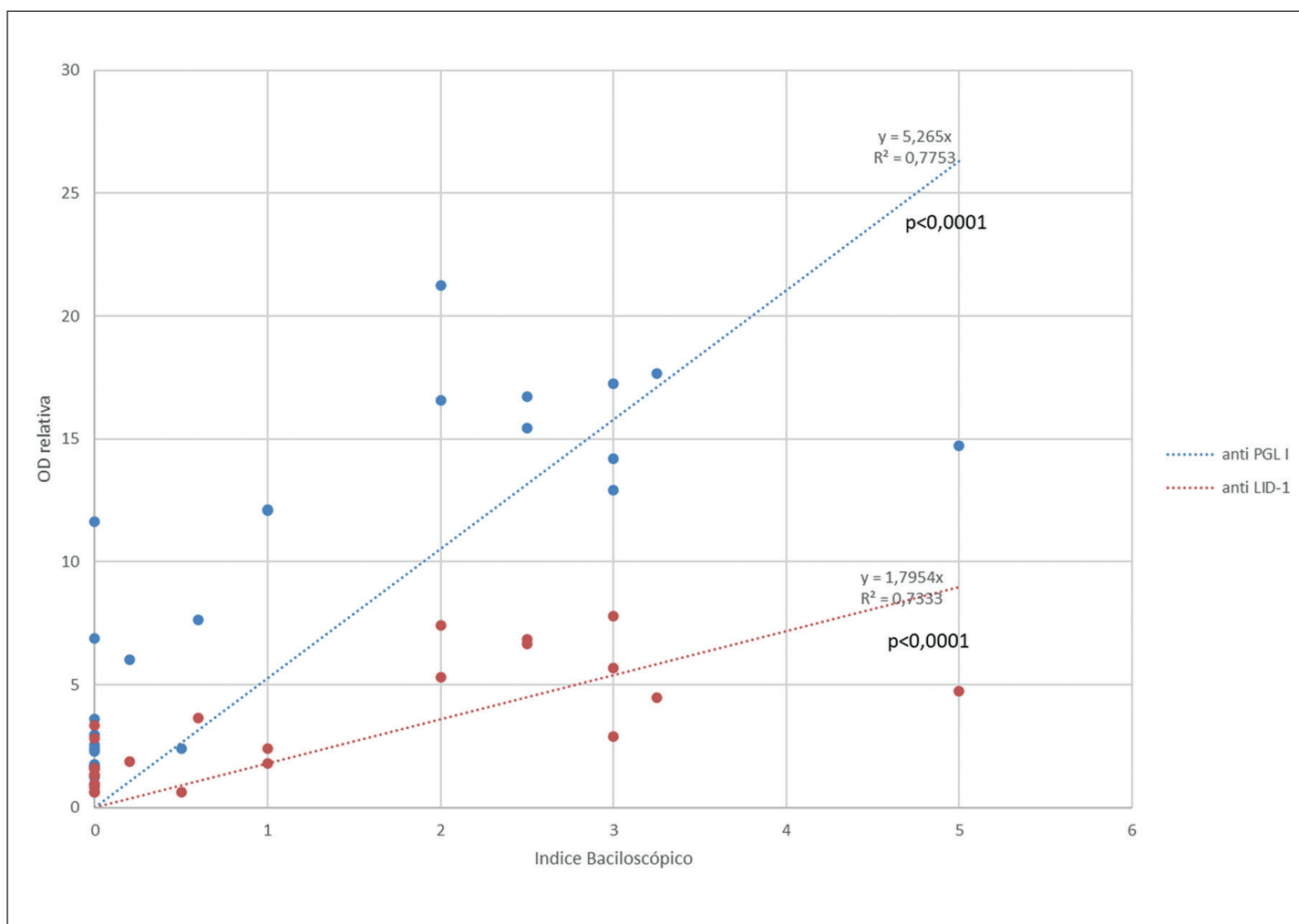


Figura 4. Resultados de ELISA anti PGL I y LID-1 en función al índice baciloscópico. La OD relativa de la prueba de ELISA anti PGL I y LID-1 en función al índice baciloscópico mostró una correlación significativa (correlación de Pearson; $*p < 0,0001$).

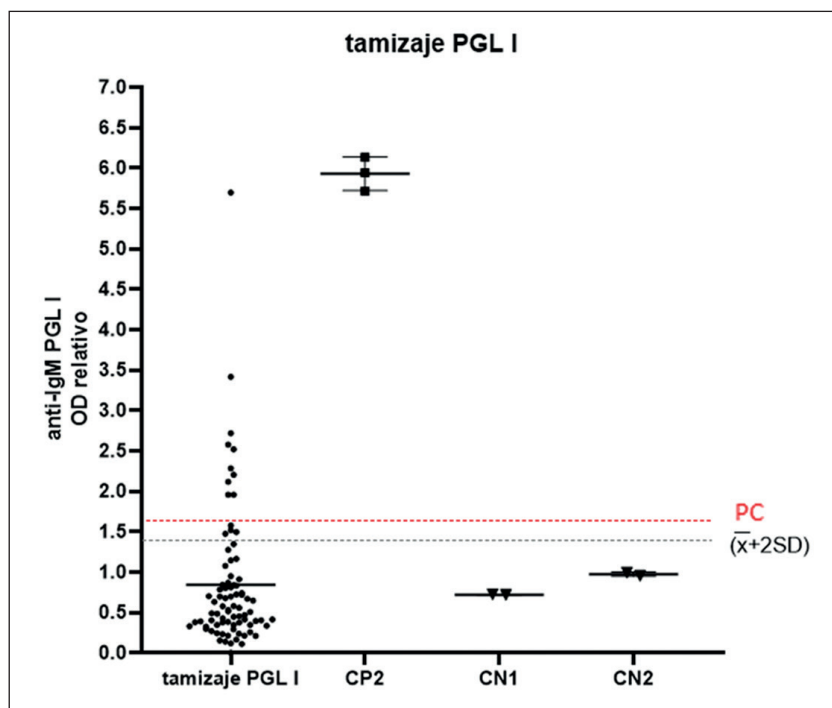


Figura 5. Tamizaje mediante ELISA anti PGL I en sueros anonimizados de individuos sin antecedentes clínicos de lepra. Representación gráfica de los valores de O.D. relativos obtenidos a partir de 81 sueros. Los niveles de OD se normalizaron en relación a la media + 1 desvíos estándar de la O.D. del control negativo 2 (CN2). El punto de corte (PC) corresponde a la línea roja.

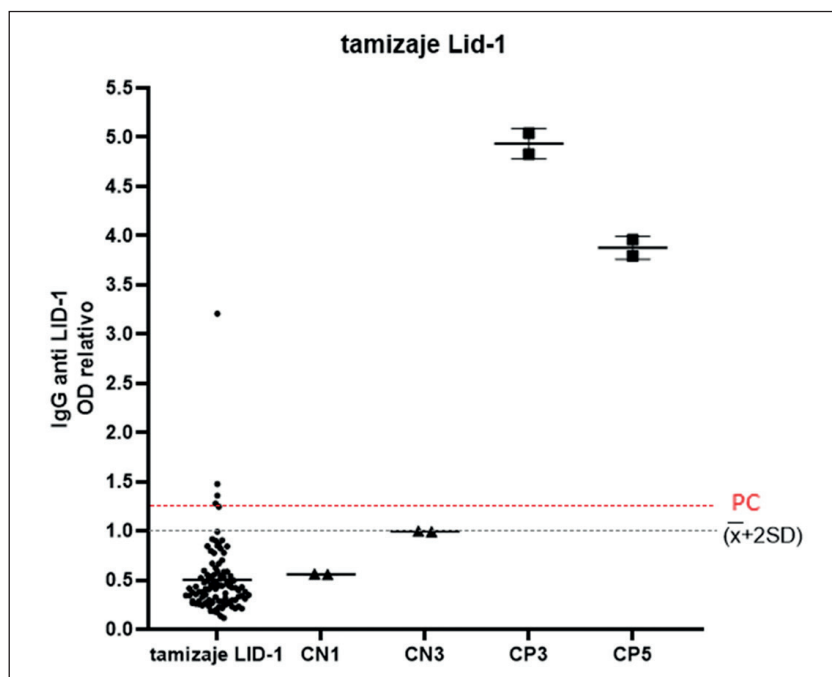


Figura 6. Tamizaje mediante ELISA anti LID-1 en sueros anonimizados de donantes de un banco de sangre de Asunción. Representación gráfica de los valores de O.D. relativos obtenidos a partir de 100 sueros. Los niveles de OD se normalizaron en relación a la media + 1 desvíos estándar de la O.D. del control negativo 3 (CN3). El punto de corte (PC) corresponde a la línea roja.

tación clínica y los pacientes con resultados positivos de baciloscopia son considerados MB, independientemente del número de lesiones, por esta razón la detección de la lepra MB es mucho más frecuente que la detección de la lepra PB, cuyo diagnóstico es dificultoso¹⁸. En Paraguay la tasa de detección de casos paucibacilares es nada más 11% del total de pacientes por año, esto se vio reflejado en la dificultad de detectar pacientes PB para el presente estudio, siendo que el 68% del total de pacientes estudiados fue MB.

Por mucho tiempo, la baciloscopia ha sido la única herramienta laboratorial de apoyo diagnóstico; actualmente existen ensayos inmunológicos (ELISA, tests inmunocromatográficos) y moleculares (qPCR) que complementan el diagnóstico clínico¹⁹. En este estudio, se aplicó la técnica de ELISA *in house* para la detección de anticuerpos específicos para *M. leprae*, con el fin de evaluar la seroreactividad de pacientes y contactos intradomiciliarios. La seroreactividad del ELISA PGL I detectada en este estudio fue similar a lo publicado en estudios realizados en Brasil y China, tanto en pacientes MB (89,5%), PB (66,6%), como en los contactos, MB 40% y PB 42,9%^{20,21}. Se ha reportado que los contactos domésticos seropositivos tienen tres veces más probabilidades de desarrollar lepra en comparación con los seronegativos^{22,23}. La identificación de los contactos intradomiciliarios de alto riesgo permitirá que los recursos del PNCL estén más enfocados en un seguimiento riguroso de estos contactos para la aplicación correcta de un tratamiento en caso de inicio de síntomas. Un *screening* serológico con este antígeno podría utilizarse también para la detección de individuos con infección subclínica y asintomática por *M. leprae*²⁴. En el sistema de salud de Brasil, uno de los países con más casos de lepra en el mundo, se han incorporado pruebas serológicas empleadas como herramienta de apoyo en la evaluación de los contactos, con el fin de indicar qué grupos deben ser monitoreados de cerca²⁵. Anteriormente se consideraba que la detección de IgM anti PGL I podría ser buena herramienta en el diagnóstico de la enfermedad tanto multibacilar como paucibacilar²⁶, pero estudios posteriores demostraron que la detección de anticuerpos es especialmente útil para el apoyo en el diagnóstico de lepra MB, no así en pacientes con PB, lo cual se correlaciona directamente con el tipo de respuesta inmune que generalmente caracteriza a ese polo de la enfermedad²⁷. La forma paucibacilar es considerada la forma resistente de la enfermedad, se caracteriza por presentar una baja carga bacilar debido a la inmunidad mediada por células predominante en este polo; se ha publicado que las lesiones de estos pacientes tienen predominio de células T CD4+ y granulomas bien formados, asociados a un patrón de respuesta Th1 donde

hay producción de IL-2, TNF- α e IFN- γ . Estas moléculas activan macrófagos que destruyen al bacilo debido a la liberación de radicales libres, además de la generación de un infiltrado granulomatoso compuesto por macrófagos y linfocitos. En este polo de la enfermedad, la inmunidad mediada por células se conserva y hay poca evidencia de inmunidad humoral específica de *M. leprae*. Es por ello que la detección de anticuerpos anti-PGL I tiene un valor limitado en la identificación de pacientes con lepra paucibacilar²⁸. Por otro lado, se ha reportado que en áreas endémicas se pueden observar valores elevados de anticuerpos IgM anti PGL I en individuos que no desarrollan la enfermedad debido a la continua exposición a micobacterias^{10,21}. Esto se correlaciona con reportes de especificidad de la prueba de PGL I superior al 80%; sin embargo, su sensibilidad como predictor del desarrollo clínico de la enfermedad es inferior a 50%²⁹.

El nivel de detección de anticuerpos IgG anti LID-1, mostró un patrón similar al PGL I en cuanto a la serorreactividad de pacientes MB (78,9%) y PB (44,4%). En un estudio realizado en Brasil, para este antígeno se reportó un porcentaje de serorreactividad similar en MB (83,7%), pero un menor porcentaje para casos PB (20%)³⁰. Por otro lado, en un estudio realizado en una zona hiperendémica de Brasil, se reportaron resultados similares a lo obtenido en este trabajo, siendo la serorreactividad de 71,4% para MB y 52,9% para PB³¹. En la evaluación de contactos, se reportó serorreactividad a LID-1 en 53,5% y 50% en HCMB y HCPB, respectivamente³²; no obstante, en el presente trabajo solo se observó serorreactividad en 42,9% de los HCPB y ninguno del grupo HCMB. Se ha publicado que la serorreactividad a LID-1 puede predecir la enfermedad seis a ocho meses antes de la aparición de los síntomas clínicos³³, resaltando la importancia del uso de estas pruebas para el seguimiento de los contactos. También se debe considerar el factor tiempo en la evaluación de contactos, es decir, que el riesgo de desarrollar la enfermedad puede cambiar con el tiempo de exposición al patógeno, lo cual podría impactar en la precisión de estas pruebas en el seguimiento de los contactos²⁷. En este estudio también se reflejó el desempeño de las pruebas de PGL I y LID-1 en muestras de suero de voluntarios sanos, observándose OD relativas por debajo del punto de corte en todo el grupo. Una prueba de diagnóstico serológico capaz de identificar de forma específica y permitir el tratamiento de la lepra en etapa temprana podría ayudar a reducir la transmisión, prevenir discapacidades funcionales y deformidades estigmatizantes y ser herramienta útil en la lucha de la erradicación de la lepra.

Estudios previos han demostrado una correlación entre la serorreactividad ante PGL I y LID-1 y el índice bacilosκόpio, razón por la cual se los considera un buen marcador de la carga bacteriana^{34,35}. Esto concuerda con

los resultados obtenidos en este estudio, donde se observó un aumento de serorreactividad en ambos antígenos a medida que aumentaba el índice bacilosκόpio, observándose inclusive 100% de serorreactividad en aquellos pacientes con índice bacilosκόpio mayor a dos cruces, tanto para PGL I como LID-1, observándose también una correlación positiva estadísticamente significativa entre el IB y los valores de OD relativos obtenidos para cada paciente. A partir de esta correlación, se deduce que aquellos contactos serorreactivos han estado expuestos a *M. leprae*, teniendo en cuenta que los anticuerpos IgM anti-PGL I se consideran marcadores confiables de exposición al bacilo y no necesariamente de infección o enfermedad²⁶. Entre los contactos domésticos, especialmente de los casos índice de MB, la positividad de PGL I es un marcador conocido de mayor riesgo de desarrollar lepra²⁹. Aunque existe una asociación clara y consistente entre la positividad a los anticuerpos anti-PGL-1 y el desarrollo de lepra en contactos, según un estudio realizado en Bangladesh, si solo se utilizara la serología anti-PGL I como herramienta de diagnóstico predictor, la mitad de los nuevos casos de lepra no se detectarían utilizando únicamente la serología anti-PGL I como herramienta de diagnóstico predictor. Aplicándose particularmente a casos PB, así también se observó tasa de falsos positivos de 86% cuando se utilizó la serología anti-PGL I como marcador predictor de lepra, debido a que de 99 contactos positivos para anticuerpos anti-PGL I, 85 nunca desarrollaron lepra; de ahí la importancia de emplear en conjunto las herramientas existentes y no de forma aisladas¹⁴.

Como se ha mencionado, en áreas endémicas se pueden observar valores elevados de OD ante PGL I en individuos que no desarrollan la enfermedad, debido a la continua exposición a micobacterias, pero se ha probado su utilidad en el tamizaje en zonas consideradas no endémicas³⁶. En este contexto, hemos evaluado la serorreactividad ante PGL I en individuos sin antecedentes clínicos de lepra, detectándose serorreactividad en 12,35% (12/81). La serorreactividad ante el PGL I correspondió a individuos provenientes de zonas como Central, Cordillera y la Capital, áreas con baja prevalencia de lepra, según datos del Programa Nacional de Control de Lepra del Ministerio de Salud de Paraguay⁵, así también, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la prueba de tamizaje LID-1, considerando que fueron empleadas muestras de suero provenientes de un banco de sangre de un hospital privado de la capital Asunción, la serorreactividad detectada fue de 4,0% (4/100). Se ha reportado que menos del 5% de las personas expuestas a *M. leprae* desarrollan enfermedad clínica y entre 1,7 y 35% de las personas que viven en áreas endémicas podrían presentar infección subclínica con formación de anticuerpos contra PGL I³⁷. Un estudio

donde en la población general de una zona endémica de Brasil, reportó serorreactividad de 7,9% para NDO-HSA, 21,9% LID-1 y 41,2% NDO-LID. (NDO es un disacárido mimético sintético de PGL I conjugado con albúmina de suero bovino (BSA) o humano (HSA) para su empleo en pruebas serológicas y NDO-LID es un conjugado de LID-1 con el disacárido NDO)³⁸. Por otro lado, en una zona considerada no endémica en Brasil, resultaron serorreactivos al PGL I 34,3% de sujetos sanos sin historial de contacto con pacientes con lepra, concluyendo que la prevalencia inesperadamente alta de serorreactividad en esta población podría indicar una exposición comunitaria continua a antígenos de *M. leprae* y altas tasas de infección subclínica³⁶. En Indonesia, compararon la tasa de positividad al ELISA anti PGL I en poblaciones escolares de áreas endémicas versus no endémicas observándose 48,3 y 8,3% de serorreactividad, respectivamente³⁹; por consiguiente, los resultados obtenidos en el presente estudio podría ser indicio de una endemidad no registrada, como también la posible existencia de lepra subclínica en ciertas áreas del país, reflejando así la necesidad de abordar estudios que aporten al conocimiento de la realidad epidémica de esta enfermedad en el Paraguay. Desde otro punto de vista, estos resultados podrían estar indicando posible migración de personas de áreas endémicas a áreas no endémicas. En un estudio en Brasil se reportó que la lepra estaba significativamente asociada con la migración de los últimos cinco años y esto puede deberse en parte por los patrones espaciales y temporales de movimiento en y entre áreas identificadas por el Ministerio de Salud de Brasil como grupos altamente endémicos para la transmisión de la lepra⁴⁰.

Las pruebas de serología, como el ELISA anti PGL I y LID-1, son ampliamente utilizadas en países endémicos como Brasil, como herramienta auxiliar de diagnóstico, además de ser de utilidad en el seguimiento del tratamiento^{41,42}; en este sentido, se tiene la perspectiva de evaluar estos parámetros en el mismo grupo de estudio posterior al tratamiento. Esta prueba puede considerarse como una buena opción para utilizarla en una zona no endémica como herramienta de cribado en la población, teniendo en cuenta las características de las respuestas serológicas de personas no infectadas que viven en zonas endémicas, como se ha mencionado más arriba⁴³. Así también, puede ser útil para el diagnóstico de la lepra neural pura, la cual representa un reto diagnóstico para el personal sanitario, incluso para aquellos con amplia experiencia, debido a que típicamente afecta al sistema nervioso periférico como una mononeuropatía sin causar lesiones cutáneas. Sin embargo se debe mencionar que estas pruebas son positivas en menos de 50% de los pacientes con lepra neural pura, por lo que una prueba serológica negativa no descarta su presencia⁴⁴. Por otro lado, esta prueba presenta un rol

importante en el seguimiento de contactos intradomicilio; si bien no hay evidencia de que los anticuerpos IgM anti-PGL I solos puedan usarse para diagnosticar la infección por lepra, algunos estudios han observado que los contactos positivos para anticuerpos IgM anti-PGL I tienen un mayor riesgo de desarrollar lepra, reportando contactos con serorreactividad a PGL I que desarrollaron la enfermedad luego de años de seguimiento⁴⁵; no obstante, aún es necesario contar con una firma de biomarcadores más amplia y específica para la detección temprana de la lepra especialmente en zonas endémicas⁴⁶. Teniendo en cuenta el esfuerzo de varios grupos de investigación en establecer pruebas de diagnóstico que utilicen el antígeno PGL I o LID-1 para la detección temprana y específica de la lepra, resulta interesante evaluar si estas pruebas presentan reacciones cruzadas con otros grupos de micobacterias. *Mycobacterium leprae* y *M. tuberculosis* comparten 90% de sus genes codificantes; por tanto, la mayoría de las fracciones antigénicas presentan reacciones cruzadas como reflejo de estas homologías, resultando específica para *M. leprae* solo unas pocas moléculas antigénicas; una de ellas es el PGL I, el cual es un glicolípido fenólico que es altamente específico de *M. leprae*. Es una molécula que se encuentra en la superficie de la bacteria y no está presente en otras micobacterias, lo que le otorga una buena especificidad para el diagnóstico de lepra⁴³. Sin embargo, en un estudio realizado en India, se detectó reacción cruzada con antígenos de *Leishmania donovani* y con sueros de pacientes con leishmania visceral⁴⁷. LID-1 es altamente específica para *M. leprae* y ha demostrado ser sensible y específica, con menos probabilidades de reacción cruzada³³.

Entre las limitaciones presentadas en la realización de este trabajo se pueden mencionar factores observados durante el reclutamiento de pacientes y contactos en el proceso de diagnóstico y el estigma asociado a esta enfermedad. Como el diagnóstico de la lepra se basa en la evidencia, se requiere la presencia de al menos una manifestación clínica; por esta razón, el diagnóstico de la lepra multibacilar es mucho más frecuente que el diagnóstico de la lepra paucibacilar, cuyo diagnóstico representa un mayor desafío; siendo así, en este estudio fue mayor el reclutamiento de pacientes MB que PB. Así también hemos observado componentes económicos ya que existe limitación económica para el desplazamiento al PNCL y sociales como el miedo a la estigmatización que afectaron el reclutamiento de pacientes; estos factores también contribuyen a la detección tardía de la enfermedad. Todos estos factores dificultaron el reclutamiento de la población de estudio, sin embargo se pretende aumentar el tamaño de muestras, así también comparar los resultados obtenidos con datos en población brasileña provistos por la Fiocruz, con el fin de tener una estadística más robusta.

Conclusión

Se aplicó la técnica del ELISA *in house* anti PGL I y LID-1 en una variedad de grupos de estudio, *i.e.*, sueros de pacientes de diferentes polos de la enfermedad, contactos, sueros anonimizados de pacientes sin antecedentes clínicos, sueros de banco de sangre y de voluntarios sanos de zonas no endémicas del Paraguay. El presente estudio piloto permitió establecer un valor de punto de corte como punto de partida para estudios de mayor envergadura. Además en la población estudiada, este ensayo de ELISA mostró utilidad en pacientes y sus contactos, así como detectó positividad en sueros

de individuos sin antecedentes clínicos de lepra. Los pacientes y sus contactos están bajo seguimiento y serán evaluados post tratamiento.

Agradecimientos. Especial agradecimiento a la MSc. Zunilda Sánchez del departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS) de la Universidad Nacional de Asunción-Paraguay, por su aporte en la realización de los ensayos de ELISA y a la Lic. Claudia Ramírez del Programa Nacional de Control de la Lepra-Paraguay, por su colaboración en la toma de muestra durante el reclutamiento de pacientes y contactos.

Referencias bibliográficas

- Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015; 45(9): 383-93. doi: 10.1016/j.medmal.2015.09.002.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255-73. PMID:
- WHO. Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. World Health Org. 2017; 1: 87. <https://www.who.int/publications/i/item/9789290226383>
- Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol [Internet].* 2015; 33(1): 26-37. doi:10.1016/j.clindermatol.2014.07.002
- PNCL. Manual de Normas y Procedimientos Paraguay 2015 Programa Nacional de Control de Lepra. 2015. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/09/914011/manual_lepra_2015versionweb.PDF
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Lepra (mal de Hansen) [Internet]. 27 de enero de 2023. [cited 2024 Jan 30]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>
- Burki T. Fight against leprosy no longer about the numbers. *Lancet Infect Dis [Internet].* 2011; 10(2): 74. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70015-3.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Estrategia mundial para la lepra 2016 - 2020. 2016: 11-13. <https://www.paho.org/es/documentos/estrategia-mundial-para-lepra-2016-2020-acelerar-accion-hacia-mundo-sin-lepra#:~:text=La%20Estrategia%20mundial%20de%20eliminaci%C3%B3n,la%20infecci%C3%B3n%20en%20la%20comunidad.>
- Düppre NC, Camacho LAB, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JAC, et al. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008; 102(7): 631-8. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.04.015
- Gama RS, Leite LA, Colombo LT, Fraga LA de O. Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020; 53:e20200197. doi: 10.1590/0037-8682-0197-2020
- Alecrin ES de, Oliveira ALG de, Guimarães NS, Lyon S, Martins MAP, Rocha MO da C. Factors associated with the development of leprosy in Brazilian contacts: a systematic review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2022; 64:e55. doi: 10.1590/1980-549720210039.
- Oliveira C, Fabri C, Paula A, Carvalho M, Vieira NF, Bueno IDC, et al. Integrative literature review of the reported uses of serological tests in leprosy management. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016; 49(2): 158-64. doi: 10.1590/0037-8682-0226-2015
- Douglas JT, Cellona R V, Fajardo TT, Abalos RM, Balagon MVF, Klatser PR, et al. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts. 2004; 11(5): 897-900. doi:10.1128/CDLI.11.5.897-900.2004
- Richardus RA, van der Zwet K, van Hooij A, Wilson L, Oskam L, Faber R, et al. Longitudinal assessment of anti-PGL I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(12): 1-13. doi: 10.1371/journal.pntd.0006083
- Herwanto N, Rosita C, Prakoeswa S, Izumi S, Duthie MS, Agusni I, et al. Potential for serodiagnosis of Indonesian leprosy patients by detecting antibodies against LID-1. 2019; 11: 19-21. doi: 10.4081/dr.2019.8018
- Marçal PHF, Fraga LA de O, Mattos AMM de, Menegati L, Coelho A da CO, Pinheiro RO, et al. Utility of immunoglobulin isotypes against LID-1 and NDO-LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113(5): e170467. doi: 10.1590/0074-02760170467
- Mizoguti D, Hungria EM, Freitas AA, Oliveira RM, Cardoso LPV, Costa MB, et al. Multibacillary leprosy patients with high and persistent serum antibodies to leprosy IDRI diagnostic-1/LID-1: Higher susceptibility to develop type 2 reactions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015; 110(7): 914-20. doi: 10.1590/0074-02760150198.
- Programa Nacional de Control de Lepra MSP y BS. ATENCIÓN DE LA DISCAPACIDAD: PERSPECTIVA DEL PAÍS- PARAGUAY [Internet]. World Health Organization. 2020. p. 1-37. Available from: <https://www.who.int/docs/default-source/ntds/leprosy/global-consultation->
- Jardim MR, Antunes SLG, Simons B, Wildenbeest JG, Nery JAC, Illarramendi X, et al. Role of PGL I antibody detection in the diagnosis of pure neural leprosy. *Lepr Rev.* 2005; 76(3): 232-40. doi: 10.47276/le.76.3.232.
- Wang H, Liu W, Jin Y, Yu M, Jiang H, Tamura T, et al. Detection of antibodies to both *M. leprae* PGL I and MMP-II to recognize leprosy patients at an early stage of disease progression. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015; 83(3): 274-7. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.012
- Carvalho APM, Coelho A da CO, Correa-Oliveira R, Lana FCF. Specific antigen serologic tests in leprosy: implications for epidemiological surveillance of leprosy cases and household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017; 112(9): 609-16. doi:10.1590/0074-02760160505.
- Prasad PVS, Kaviarasan PK, Kannambal K, Poorana B AR. Recent advances in diagnostic techniques and new hope towards leprosy elimination in the post elimination era. *J Clin Dermatol Ther.* 2017; 4:027. doi: 10.24966/CDT-8771/100027
- White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st century. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(1): 80-94. doi: 10.1128/CMR.00079-13.
- Barreto JG, Bisanzio D, Frade MAC, Moraes TMP, Gobbo AR, Guimarães L de S, et al.

- Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015; 15(1): 1-9. doi: 10.1186/s12879-015-1254-8.
25. Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase [Internet]. Brasil. 2022.1-107p. Available from: https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/protocolos/20220818_pcdt_hanseníase.pdf
26. Lopes-Luz L, Saavedra DP, Fogaça MBT, Bühner-Sékula S, Stefani MM de A. Challenges and advances in serological and molecular tests to aid leprosy diagnosis. *Exp Biol Med*. 2023; 248(22): 2083-94. doi: 10.1177/15353702231209422.
27. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, 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*. 2003; 41(5): 1991-5. doi: 10.1128/JCM.41.5.1991-1995.2003.
28. Froes Jr LAR, Trindade MAB, Sotto MN. Immunology of leprosy. *Int Rev Immunol*. 2022 Feb 21; 41(2): 72-83. doi:10.1080/08830185.2020.1851370.
29. Penna MLF, Penna GO, Iglesias PC, Natal S, Rodrigues LC. Anti-PGL-1 Positivity as a risk marker for the development of leprosy among contacts of leprosy cases: systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(5):e0004703. doi: 10.1371/journal.pntd.0004703.
30. Silva E, Sammarco P, Faria A, Broch N, Ura S, Tomimori J. Serodiagnosis of leprosy and follow-up of household contacts using a commercial rapid test containing ND-O/LID-1 antigens. *Lepr Rev*. 2017; 88(2): 174-83. doi: 10.47276/lr.88.2.174.
31. Gama RS, de Souza MLM, Sarno EN, de Moraes MO, Gonçalves A, Stefani MMA, et al. A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst household contacts. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(6): 1-22. doi: 10.1371/journal.pntd.0007400.
32. Ferreira Marçal PH, De Oliveira Fraga LA, Meneses de Mattos AM, Menegati L, da Conceicao Coelho A, Olmo Pinheiro R, et al. Utility of immunoglobulin isotopes against LID-1 and NDO-LID for, particularly IgG1, confirming the diagnosis of multibacillary leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018; 113(5): 1-8. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170467>
33. Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Cardoso LP V, Martelli CMT, et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol*. 2007; 14(11): 1400-8. doi: 10.1128/CVI.00299-07.
34. Hungria EM, Bühner-Sékula S, de Oliveira RM, Aderaldo LC, Pontes AA, Cruz R, et al. Leprosy reactions: The predictive value of *Mycobacterium leprae*-specific serology evaluated in a Brazilian cohort of leprosy patients (U-MDT/CT-BR). *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(2): e0005396. doi: 10.1371/journal.pntd.0005396.
35. Espinosa OA, Benevides Ferreira SM, Longhi Palácio FG, Cortela D da CB, Ignotti E. Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) in detecting antibodies against *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: a systematic review and meta-analysis. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2018; 2018: 9828023. doi: 10.1155/2018/9828023.
36. Frade MAC, de Paula NA, Gomes CM, Vernal S, Bernardes Filho F, Lugão HB, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(2): 1-12. doi: 10.1371/journal.pntd.0005375.
37. Worobec SM. Treatment of leprosy/Hansen's disease in the early 21st century. *Dermatol Ther*. 2009; 22(6): 518-37. doi: 10.1111/j.1529-8019.2009.01274.x
38. Fabri A da COC, Carvalho APM, Araujo S, Goulart LR, de Mattos AMM, Teixeira HC, et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. *BMC Infect Dis*. 2015; 15(1): 1-9. doi: 10.1186/s12879-015-0962-4.
39. Adriaty D, Sp CR, Iswahyudi, Wahyuni R, Agusni I, Izumi S. Leprosy transmission in endemic and non-endemic areas based on the profile of antibody response of PGL-1 and PCR detection of *Mycobacterium leprae* DNA from nasal swab among healthy children of East Java, Indonesia. *Infect Dis Rep*. 2020; 12(Suppl 1): 8748. doi: 10.4081/idr.2020.8748.
40. Murto C, Chammartin F, Schwarz K, da Costa LMM, Kaplan C, et al. (2013) Patterns of migration and risks associated with leprosy among migrants in Maranhão, Brazil. *PLOS Negl Trop Dis* 7(9): e2422. doi: 10.1371/journal.pntd.0002422.
41. Limeira OM, Gomes CM, Morais OO De, Cesetti MV, Alvarez RRA. Active search for leprosy cases in midwestern Brazil: a serological evaluation of asymptomatic household contacts before and after prophylaxis with bacillus Calmette-Guérin. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013; 55(3): 173-7. doi: 10.1590/S0036-46652013000300006.
42. Amorim FM, Nobre ML, Ferreira LC, Nascimento LS, Miranda AM, Monteiro GRG, et al. Identifying leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-NDO. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Sep; 10(9): e0004934. doi: 10.1371/journal.pntd.0004934.
43. Longoni SS, Beltrame A, Prato M, Spencer JS, Bergamaschi N, Clapasson A, et al. ELISA test based on the phenolic glycolipid-I (PGL I) of *Mycobacterium leprae*: a reality of a laboratory from a non-endemic country. *pathogens*. 2022; 11(8): 894. doi: 10.3390/pathogens11080894.
44. Serrano-Coll H, Miele O, Escorcía C, Díaz A, Beltrán C, Cardona-Castro N. A case series of pure neural leprosy in patients diagnosed in a specialized center for the control of Hansen's disease in Colombia. *Biomedica*. 2018 Jun 15; 38(2): 153-61. doi: 10.7705/biomedica.v38i0.3690.
45. Lema T, Bobosha K, Kasang C, Tarekegne A, Lambert S, et al. (2023) Reaching those at risk: active case detection of leprosy and contact tracing at Kokosa, a hot spot district in Ethiopia. *PLOS ONE* 18(6): e0264100. doi: 10.1371/journal.pone.0264100.
46. Richardus RA, van der Zwet K, van Hooij A, Wilson L, Oskam L, Faber R, et al. Longitudinal assessment of anti-PGL I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(12):e0006083. doi: 10.1371/journal.pntd.0006083.
47. Pratap Narayan G, Roma S, Ananya S, Nahid A. ¿Es el glicolípido fenólico I realmente un antígeno específico para la lepra? *Clin Infect Dis* 2010; 50 (6): 937-8, doi: 10.1086/650541.