

Pruebas inmunológicas diagnósticas en la enfermedad de Hansen

Elsa Rada¹

elsa.rada@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-1301-0462>

Lucibel Crespo¹

lucibelcrespo@gmail.com

Ramón Guevara²

drmonra@gmail.com

¹Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

²Instituto de Biomedicina "Dr Jacinto Convit", Ministerio del Poder Popular para la Salud.

RESUMEN

La enfermedad de Hansen presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas e histopatológicas, las cuales son un reflejo de la naturaleza de la respuesta inmunológica del individuo ante diversos componentes del *Mycobacterium leprae*. La interacción entre el sistema inmune del huésped y diferentes componentes micobacterianos nos permite conocer aspectos de la respuesta inmunológica diferencial tanto serológica como respuesta celular en los pacientes con enfermedad de Hansen. En este trabajo se trata de resumir los avances en las últimas 4 décadas realizados en la enfermedad de Hansen sobre las pruebas inmunológicas diagnósticas (hipersensibilidad retardada HR, proliferación celular *in vitro* y pruebas de anticuerpos) aplicadas tanto en el Instituto de Biomedicina como ensayos actualizados realizados en otras diferentes instituciones en zonas endémicas de la enfermedad de Hansen.

Palabras Clave: Pruebas inmunológicas; enfermedad de Hansen; Diagnóstico; Lepra

IMMUNOLOGICAL DIAGNOSTIC TESTS IN HANSEN'S DISEASE

ABSTRACT

Hansen's disease has a wide spectrum of clinical and histopathological manifestations, which are a reflection of the nature of the individual's immune response to various components of *Mycobacterium leprae*. The interaction between the host's immune system and different mycobacterial components allows us to know aspects of the differential immune response both serological and cellular response in patients with Hansen's disease. This paper involves summarizing the advances in the lasts 4 decades in Hansen's disease on diagnostic immunological testing (delayed hypersensitivity HR, *in vitro* cell proliferation and antibody tests) applied at both the Biomedicine Institute and updated trials conducted in other different institutions in areas endemic to Hansen's disease.

Keywords: Immune tests; Hansen's disease; Diagnostic; Leprosy

INTRODUCCIÓN

La lepra es una enfermedad infecciosa de baja transmisibilidad, no hereditaria. Hasta la primera década del siglo XXI y desde muchas décadas antes sólo se conocía el *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) como único causante de la enfermedad, pero desde el 2008 se ha implicado otra especie de micobacteria, el *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*) como agente de un tipo de lepra grave, la lepra lepromatosa difusa o lepra de Lucio la cual se expresa clínicamente con grandes zonas de necrosis (Han *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2015). El bacilo tiene preferencia por la piel y los nervios periféricos, pero puede afectar cualquier órgano menos el sistema nervioso central y los pulmones; sin embargo el *M. lepromatosis* está señalado de producir una enfermedad vascular causada por la invasión micobacterial de los vasos con vasculitis y oclusión vascular y con una alta morbilidad y mortalidad (Han *et al.*, 2013). Ambos son bacilos intracelulares obligatorios y no son cultivables en ningún medio. La lepra es una enfermedad granulomatosa crónica y en el caso de la lepra producida por el *M. leprae*, sus formas clínicas se presentan en forma de espectro por la interacción del sistema inmunitario del huésped ante la invasión de la micobacteria.

La enfermedad de Hansen es una enfermedad de evolución lenta que se presenta con mayor frecuencia en la población adulta. Sin embargo en la infancia representa un problema de salud pública ya que refleja la transmisión activa de la enfermedad en la población y una exposición temprana al bacilo.

Una vez que el bacilo penetra al organismo, es fagocitado por los macrófagos y por las células dendríticas, produciéndose una primera fase donde actúa la inmunidad innata del individuo estableciéndose la infección, se produce una interacción entre la inmunidad del individuo y los mecanismos de evasión del *M. leprae* que trata de evadir los mecanismos de defensa del huésped.

Algunas veces las lesiones pasan desapercibidas y se confunden con otras patologías, entre ellas, enfermedades que cursan con máculas hipocrómicas: *Pitiriasis alba*, *Pitiriasis versicolor*, vitíligo, nevus

acrónico o lesiones residuales tales como, hipocromía post inflamatorias y lesiones de psoriasis. También tenemos enfermedades con placas eritematosas: granuloma anular, *Tinea corporis*, esclerodermia, lupus eritematoso subagudo y sarcoidosis. Enfermedades que evolucionan con numerosas lesiones de tipo macular, placas y nódulos: leishmaniasis difusa, neurofibromatosis, sífilis, xantomatosis, linfomas, eritema multiforme y granulomatosis por sustancias inertes (Aranzazu, 1994).

La lepra se presenta en la edad adulta temprana con discapacidades por lo tanto su diagnóstico precoz, el adecuado manejo, el tratamiento específico de la misma, junto con el de la neuritis y los fenómenos reaccionales contribuirán a la disminución de las secuelas incapacitantes y a su erradicación definitiva. En la mayoría de los casos el diagnóstico clínico es tardío, ya que solo es posible realizarlo, una vez que se ha iniciado la sintomatología con la presencia de lesiones cutáneas y el daño de los nervios comprometidos.

En 1962 se desarrolló un sistema de clasificación basada en la correlación clínico, inmunológica e histopatológica. En el espectro de la enfermedad se encuentran las siguientes formas: Tuberculoide (LT), Bordeline Tuberculoide (BT), Bordeline Bordeline (BB), Bordeline Lepromatosa (BL) y Lepromatosa (LL). Desde la introducción de la poliquimioterapia (PQT), la organización mundial de la salud (OMS) establece una clasificación en Paucibacilar (PB) y Multibacilar (MB) basándose en la carga bacilar del paciente y posteriormente se tomó en cuenta el número de lesiones y los nervios involucrados, siendo muy útil para la asignación de grupos de tratamiento (Ridley *et al.*, 1966; WHO, 2000).

El tratamiento de la lepra tanto para adultos como niños usando poliquimioterapia (PQT) está formado por tres drogas antimicobacterianas: dapsona, rifampicina y clofazimina; 6 meses para pacientes PB y 12 meses para las formas clínicas MB, siempre tomando en cuenta que existen empaques ajustados por la OMS para niños de 10 a 14 años y para los menores de 10 años, la dosis debe ser ajustada al peso corporal (WHO, 2018).

Pruebas inmunológicas *in vivo* e *in vitro*

El diagnóstico temprano es uno de los mayores obstáculos en el control de la enfermedad. En el estudio inmunológico se evalúa la respuesta celular tanto *in vivo* como *in vitro* y la respuesta humoral. Mucho antes del conocimiento del genoma del *Mycobacterium leprae* y de pruebas serológicas muy específicas para el diagnóstico de la enfermedad, se contaba con dos tipos de antígenos para medir la respuesta celular *in vivo*: El Mitsuda y el antígeno proteico completo de *M. leprae*. El Mitsuda o lepromina-H es un antígeno particulado del cuerpo bacilar, la cual está en desuso porque su preparación es a partir de material de armadillo infectado y en la actualidad no se cuenta en ninguna parte del mundo con colonias de armadillos para la obtención del mismo. La reacción positiva de Mitsuda tuvo un valor pronóstico y permitió clasificar y pronosticar el estado de resistencia ante la enfermedad (Krotoski *et al.*, 1993). El antígeno soluble proteico de *M. leprae* (antígeno Convit) preparado y utilizado durante varias décadas en el Instituto de Biomedicina, se utilizó en diferentes pruebas entre ellas están, las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada (HR) y en estudios *in vitro* tanto en la respuesta inmunológica mediada por células como en los estudios *in vitro* en la respuesta de anticuerpos. Para la obtención del antígeno proteico completo de *M. leprae*, inicialmente se procedió a la purificación del bacilo siguiendo el protocolo de Draper (Draper, 1979), proveniente del tejido de armadillo infectados experimentalmente. La obtención del extracto proteico de *M. leprae* utilizado para las pruebas de HR se procesó en el laboratorio de Inmunología II bajo la dirección de la Dra. Marian Ulrich[†], coordinadora del laboratorio, donde una fracción proteica del sobrenadante se obtuvo mediante la ruptura parcial de los bacilos purificados utilizando una celda de presión (prensa francesa), bajo una presión de 10.000 libras. El extracto obtenido de esta manera fue subfraccionado al pasarlo a través de un sistema de ultrafiltración Amicon, luego se utilizó una membrana PM-30 que retiene moléculas por encima de 30.000 daltons y la fracción obtenida fue un antígeno de bajo peso molecular (Ulrich *et al.*, 1986). El antígeno soluble fue una prueba usada en su

momento para medir infección y se comportó como un antígeno de tipo tuberculínico donde la lectura se realiza a las 48 horas y se considera positiva una induración \geq de 12 mm (Pinaridi *et al.*, 1994), la cual tuvo problemas de especificidad al presentar sensibilidad cruzada con el PPD (Gupte *et al.*, 1990). En base a los estudios preliminares utilizando el antígeno Convit y el antígeno Rees, se han concentrado los esfuerzos en preparar nuevos antígenos para pruebas cutáneas en la enfermedad de Hansen (Brennan, 2000). Estos antígenos de segunda generación son: MLSA-LAM, antígeno soluble desprovisto de lipoglicanos principalmente la molécula lipoarabinomano y el MLC-WA antígeno proteico de pared celular los cuales han sido ensayados en conejillos de india encontrándose una fracción proteica de la membrana del *M. leprae* prometedora para estudios en las pruebas intradérmicas. Recientemente estudios realizados con estos antígenos anteriormente señalados se probaron en regiones no endémicas de Hansen (USA) (Brennan, 2000). En los primeros ensayos ejecutados en fase I, los individuos recibieron tres dosis (2,5 μ g, 1 μ g y 0,1 μ g) de cada uno de los antígenos paralelamente con el antígeno Rees MLSA luego se realizó un ensayo doble ciego (fase II) en zona endémica (Nepal) donde colocaron una dosis alta y una baja dosis (1 μ g y 0,1 μ g) dividieron la población (BL/LL, BT/TT,TB) y no casos; donde resultó que estos antígenos fueron seguros para el uso en humanos pero la sensibilidad obtenida fue baja (20-25%) y concluyen que estos antígenos no son adecuados para ser utilizados en pruebas de piel para la detección temprana de la enfermedad. Sin embargo, el grado de especificidad fue bastante alto por no presentar reacción cruzada con individuos que presentaron tuberculosis (TB) (Rivoire *et al.*, 2014a; Rivoire *et al.*, 2014b).

Continuando los progresos, para obtener una verdadera incidencia de la enfermedad y su impacto sobre la transmisión, es imperativo obtener una combinación de antígenos múltiples, sensibles y específicos para detectar una infección temprana con *M. leprae*. Actualmente, en vista de la alta prevalencia de casos de lepra en áreas endémicas como India, Brasil, Bangladesh y Filipinas, se realizó una prueba de

hipersensibilidad retardada en modelos animales (conejiños de india y armadillos). La proteína de *M. leprae* sensible y específica que se utilizó en el estudio, es la proteína quimérica (LID-1) la cual es capaz de distinguir entre animales infectados y no infectados presentando manifestaciones de HR similares a las presentes en pacientes PB (Duthie *et al.*, 2020).

Respuesta inmunológica mediada por células *in vitro*.

Durante la década del 1980, se realizaron en el Instituto de Biomedicina ensayos de proliferación celular de linfocitos en sangre venosa periférica en pacientes LL, BL, LT y personas sanas contactos. Estos ensayos se basaron en la respuesta de los linfocitos frente a antígenos como: el bacilo Calmette-Guérin (BCG) muerto por calor, *M. leprae* purificado y extracto soluble de *M. leprae*, donde se encontró que el tratamiento combinado utilizado por Convit y colaboradores, PQT más inmunoterapia (IMT), mostró una respuesta inmune persistente frente al extracto proteico soluble de *M. leprae* y BCG (Rada *et al.*, 1987; Rada *et al.*, 1994; Rada *et al.*, 1997b). La IMT consistió en utilizar dos microorganismos; el *M. leprae* muerto por el calor y la bacteria BCG atenuada, cuyo tratamiento se utilizó conjuntamente con PQT en pacientes con Lepra Indeterminada LI, BL y LL, llevando a conversión la reactividad intradérmica, degradación de los bacilos en la piel y marcada mejoría clínica. Continuando los estudios y con los buenos resultados obtenidos con el extracto proteico de *M. leprae* en los ensayos de proliferación celular, se seleccionaron varias fracciones proteicas con diferentes movilidades relativas de peso molecular (kDa). Para el fraccionamiento se realizó la técnica bioquímica electroforesis en poliacrilamida-SDS donde se observó una respuesta celular incrementada en cuatro fracciones proteicas, cuyos rangos fueron entre 66-65, 45-29, 22-18 y 14 kDa. Los primeros respondedores fueron los Contactos Mitsuda positivos, seguido de los pacientes tuberculoide, luego pacientes lepromatosos tratados con PQT más IMT (Rada *et al.*, 1991).

Siguiendo la búsqueda de proteínas más específicas para seguir los estudios de reactividad celular *in vitro*

se solicitó al banco de proteínas recombinantes (OMS), una serie de proteínas micobacterianas tanto de *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. leprae* de diferentes pesos moleculares, *M. tuberculosis* 70kDa, *M. bovis* 65 kDa, *M. leprae* 36, 28, 18 y 10 kDa, donde algunas proteínas ensayadas son proteínas de choque térmico y presentaron reactividad cruzada con sus homólogas en humanos sanos. Se pudo evidenciar que en la proteína completa de *M. leprae* deben haber otros componentes homólogos al extracto proteico de BCG que sean capaces de estimular la respuesta celular en los pacientes (Rada *et al.*, 1997b).

En el año 2001, a raíz de la disponibilidad de la secuencia completa del genoma del bacilo de la lepra se han obtenido secuencias genéticas que codifican a diferentes proteínas de *M. leprae* (Vissa *et al.*, 2001). Han sido muchos los progresos en la investigación post genómica, con la finalidad de encontrar los antígenos proteicos que puedan ser útiles en obtener una buena respuesta celular protectora. Durante las últimas dos décadas se han examinado alrededor de 200 proteínas bien definidas y caracterizadas con diferentes movilidades relativas utilizadas en diferentes ensayos inmunológicos (Geluk *et al.*, 2011). Recientemente, los ensayos celulares continúan utilizando biomarcadores para detección de inmunidad innata y adaptativa como de inmunidad humoral en diferentes regiones endémicas del planeta (Asia, África, Sur América). Estos estudios han señalado su importancia en la detección de individuos con baja carga bacilar contribuyendo a la detección temprana de la enfermedad (Van Hooij *et al.*, 2016; Van Hooij *et al.*, 2018; Van Hooij *et al.*, 2019).

Actividad serológica (estudios *in vitro* en la inmunidad humoral).

Sabemos que dependiendo del espectro clínico de la enfermedad, los pacientes de lepra pueden caracterizarse por tener una reactividad elevada de anticuerpos en pacientes multibacilares (LL/BL/BB) conjuntamente con una respuesta celular disminuida dirigida a antígenos del *M. leprae*, con un comportamiento inverso en los pacientes Paucibacilares (LI/LT/BT).

El glicolípido fenólico-I (GLP-I) fue descubierto en

1981, reportan que es un antígeno inmunodominante de la cubierta del *Mycobacterium leprae* (Hunter *et al.*, 1981). La detección de anticuerpos circulantes IgM anti GLP-I, a través de la metodología ELISA (ensayo inmunoenzimático) ha sido ampliamente usada como método diagnóstico en diferentes parte del mundo, sin embargo se ve limitado su valor diagnóstico en pacientes PB, ya que estos tienen índice bacteriano bajo o indetectable y estos últimos se caracterizan por su buena respuesta celular, en lugar de la respuesta humoral. En el Instituto de Biomedicina varios estudios se han realizados referentes a la respuesta de anticuerpos utilizando el GLP-I.

Durante aproximadamente dos décadas se utilizó el GLP-I nativo como método diagnóstico inmunológico para identificar a los pacientes que presentaban diferentes carga bacilar. Para el año 1991 se aplicó esta prueba a 29.113 contactos de pacientes lepromatosos en zonas endémicas de Venezuela (Táchira, Mérida y Apure) que fueron vacunados con la inmunoterapia, desarrollada por el Dr. Convit donde se evidenciaron 28 contactos con pruebas positivas frente al GLP-I. La mayoría de las lesiones encontradas fueron incipientes y que luego desaparecieron espontáneamente (Ulrich *et al.*, 1991; Convit *et al.*, 1992; Convit *et al.*, 1993).

Mientras que las pruebas para la detección de anticuerpos IgM hacia el GLP-I se utilizan para ciertas aplicaciones, el uso de esta prueba no es adecuada para estudios epidemiológicos debido al registro de una proporción significativa de individuos sanos que pueden presentar positividad frente al GLP-I.

En el sentido de lograr una prueba más específica, sencilla y con capacidad de realizar detecciones tempranas de la enfermedad, se amplía el estudio en la utilización del GLP-I, evidenciándose en su estructura química la presencia de un segmento disacárido externo, lográndose la síntesis de esta neoglicoproteína, la cual se somete a múltiples variaciones químicas, hasta hacerla capaz de unirse a la albumina bovina, dando lugar a lo que se conoce hoy en día como natural di o trisacárido octyl ligado a albúmina de suero bovino (ND-o-BSA ó NT-O-BSA) (Brennan *et al.*, 1994).

Es importante señalar que el conocimiento y

secuenciación del genoma micobacteriano, ha dado nuevas directrices para la búsqueda y síntesis de marcadores proteicos que permitan desarrollar nuevas alternativas para realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad (Vissa *et al.*, 2001).

Desafíos post genómicos

Se basan en conseguir una prueba de laboratorio que sea capaz de diagnosticar la enfermedad en personas asintomáticas o predecir la progresión de la enfermedad en áreas endémicas (Stefani, 2008; Lobato *et al.*, 2011), así como también en conseguir antígenos para ensayos serológicos altamente específicos que conjuntamente con el GLP-I permitan mejorar la sensibilidad en el diagnóstico (Reece *et al.*, 2006; Spencer *et al.*, 2012).

Duthie y colaboradores demostraron que las proteínas micobacterianas (ML0405 y ML2331) son antígenos del *M. leprae* con un potencial diagnóstico en los pacientes con lepra multibacilar independiente de la ubicación geográfica y/o zonas endémicas. Además plantearon la construcción de una proteína de fusión entre las proteínas ML0405 y la ML2331 llamada LID-1 la cual puede proporcionar una herramienta de diagnóstico antes de la aparición de signos y síntomas clínicos (Duthie *et al.*, 2008). Por lo tanto, a pesar de que *M. leprae* posee niveles de homología con otras especies de micobacterias, estas proteínas sólo se reconocen en el contexto de la lepra. Las mencionadas proteínas, se probaron en individuos contactos, de zonas endémicas en Venezuela que habían sido vacunados previamente con BCG y no desarrollaron respuesta serológica frente a LID-1 (Duthie *et al.*, 2011; Rada *et al.*, 2012). Actualmente, se han utilizado el GLP-I sintético (ND-o-BSA) antigénicamente activo o inmunodominante unido con la proteína de fusión LID-1 en diferentes regiones (ND-o-LID-1). Estudios realizados en Venezuela determinaron la respuesta de anticuerpos dirigida hacia el conjugado ND-o-LID-1 y sus componentes individuales LID-1 y ND-o- HSA en individuos del Caserío Mamaría ubicado en el Estado Portuguesa. Se incluyeron 167 individuos, clasificados en casos y contactos. Clínicamente se confirmaron 37,1% casos (62/167), de los cuales 71% (44/62) eran Paucibacilares

y 29% (18/62) Multibacilares. Al comparar la respuesta de anticuerpos entre los casos de Hansen y contactos, se observó una diferencia estadísticamente significativa (16,13% versus 5,7%, respectivamente, $p=0,013$). Al determinarse la filiación familiar de los individuos incluidos en el estudio, se detectaron tres familias de interés: C, T y H. Los casos de Lepra presentes en las tres familias representan el 42% de los casos totales, registrándose en la familia C todas las formas clínicas de esta enfermedad. Los resultados obtenidos en dicho caserío sugieren que los marcadores empleados en este trabajo son de gran utilidad para ser empleados como herramienta auxiliar para el diagnóstico de la enfermedad de Hansen en los casos multibacilares (Rada *et al.*, 2019).

Este conjugado (ND-o-BSA) ha sido probado también en diferentes regiones Brasil, Cebú Filipinas, China tanto en pacientes MB y PB, contactos de zonas endémica de la región, pacientes con tuberculosis y personas sanas demostrando una mayor sensibilidad y especificidad comparada con el GLP-I nativo y con el sintético, ND-o-BSA (Qiong-Hua *et al.*, 2013). Aunque la utilización de una prueba rápida (RDT) no ha sido lo suficientemente sensible para la detección de casos con baja carga bacilar, por lo que se han hecho modificaciones añadiendo al conjugado la proteína A para aumentar la sensibilidad (Jian *et al.*, 2020; Vaz Cardoso *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2018).

Gracias a los estudios realizados con técnicas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR), utilizando fracciones específicas de ADN de *M. leprae*, método de cierta rigurosidad, se logra un diagnóstico seguro, principalmente cuando hay pocos bacilos. La utilización del conjugado ND-o-LID-1, con biomarcadores proteicos específicos para *M. leprae* y métodos complementarios con PCR permiten conocer respuestas tanto de inmunidad innata como de inmunidad adquirida. Datos obtenidos en regiones endémicas para el monitoreo de contactos y haciendo uso de modelos matemáticos, los resultados han permitido diagnosticar casos de lepra con una alta sensibilidad y especificidad y a su vez la identificación temprana de nuevos casos entre los contactos domésticos (Gama *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

La finalidad de la estrategia mundial que se plantea para la eliminación de la lepra 2016-2020 tiene como objeto acelerar la acción hacia un mundo sin la enfermedad. Su fundamento se basa en la detección temprana de los casos utilizando biomarcadores tanto de la inmunidad innata como adquirida y de esta manera aplicar los programas de salud, antes de la aparición de las discapacidades presentes en esta enfermedad.

REFERENCIAS

- ARANZAZU N. (1994). "Enfermedad de Hansen: Etiología, Clínica y Clasificación". *Dermatol Venez* 32(4):145-151.
- BRENNAN PJ, CHATTERJEE D, FUJIWARA T, *et al.* (1994). "Leprosy-specific neoglycoconjugates: synthesis and application to serodiagnosis of leprosy". *Methods Enzymol* 242: 27-37.
- BRENNAN PJ. (2000). "Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens and an approach to the second generation". *Leprosy Rev* 71:550-54.
- CONVIT J, SAMPSON C, ZUNIGA M, *et al.* (1992). "Immunoprophylactic trial with combined *Mycobacterium leprae*/BCG vaccine against leprosy: preliminary results". *Lancet* 339: 446-450.
- CONVIT J, SMITH PG, ZUNIGA M, *et al.* (1993). "BCG vaccination protects against leprosy in Venezuela: A case-control study". *Int J Leprosy* 61:185-191.
- DRAPER P. (1980). "Purification of *M. leprae*". *Protocol 1/79. Report of the enlarged Steering Committee meeting Geneva, 7-8 February, Annex 1, Geneva: World Health Organization, TDR/IMMLEP-SWG (5)/80.3.*
- DUTHIE MS, IRETON GC, KANAUJJA GV, GOTO W, *et al.* (2008). "Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis". *Clin Vaccine Immunol* 15(10): 1590-1597.
- DUTHIE MS, HAY MN, RADA EM, CONVIT J, ITO L, *et al.* (2011). "Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treated efficacy and as recurrence prognostic markers". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 1257-1265.
- DUTHIE MS, PENA MT, KHANDHAR AP, PICONE A, *et al.* (2020). "Development of LepReact, a defined skin test for paucibacillary leprosy and low-level *M. leprae* infection". *Appl Microbiol Biotechnol* 104:3971-3979.
- GAMA RS, SOUZA MLM, SARNO EN, MORAES MO, GONÇALVES A, STEFANI MMA, GARCIA RMG, FRAGA LAO. (2019). "A novel integrated molecular and serological analysis method to predict new cases of leprosy amongst

- household contacts". *PLoS Negl Trop Dis* 13(6):1-22.
- GELUK A, DUTHIE MS, SPENCER J. (2011). "Post genomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease". *Lepr Rev* 82: 1-20.
- GUPTA MD, ANANTHARAMAN DS, NAGARAJU B, KANNAN S, VALLISHAYEE RS. (1990). "Experiences with *Mycobacterium leprae* soluble antigens in a leprosy endemic population". *Lepr Rev* 61: 132-144.
- HAN XY, SEO YH, SIZER KC, SCHOBERLE T, et al. (2008). "A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy". *Am J Clin Pathol.* 130:856-864.
- HAN XY, JESSURUN J. (2013). "Severe leprosy reactions due to *Mycobacterium lepromatosis*". *Am J Med Sci* 345(1): 65-69.
- HAN XY, MISTRY NA, THOMPSON EJ, TANG HL, et al. (2015). "Draft genome sequence of new leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis*". *Genome Announc* 3(3): 1-2.
- HUNTER SW, BRENNAN PJ. (1981). "A novel glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity". *J Bacteriol* 147:728-735.
- JIAN L, XIUJIAN S, YUANGANG Y, YAN X, LIANCHAO Y, DUTHIE MS, YANA W. (2020). "Evaluation of antibody detection against the NDO-BSA, LID-1 and NDO-LID antigens as confirmatory tests to support the diagnosis of leprosy in Yunnan province, southwest China". *Trans R Soc Trop Med Hyg* 114(3):193-199.
- KROTOSKI WA, MROCZKOWSKI TF, REA TH, ALMODOVAR PI, CLEMENTS BC, et al. (1993). "Lepromin skin testing in the classification of Hansen's disease in the United States". *Am J Med Sci* 305: 18-24.
- LOBATO J, COSTA MP, REIS EDE M, GONÇALVES MA, et al. (2011). "Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection". *Lepr Rev* 82(4):389-401.
- MUÑOZ M, BELTRAN-ALZATE JC, DUTHIE MS, SERRANO-COLL H, CARDONA-CASTRO N. (2018). "Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay using either natural octyl disaccharide-leprosy IDRI diagnostic or phenolic glycolipid-I antigens for the detection of leprosy patients in Colombia". *Am J Trop Med Hyg* 98(1): 274-277.
- VAZ CARDOSO LP, DIAS RF, FREITAS AA, et al. (2013). "Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using Smart Phone technology". *BMC Infect Dis* 13: 1-10.
- PINARDI ME, SANTAELLA C. (1994). "Pruebas intradérmicas y baciloscopia en el diagnóstico de lepra". *Dermatol Venez* 32(4):165-166.
- QIONG-HUA P, ZHONG-YI Z, JUN Y, YAN W, LIAN-CHAO Y, HUAN-YING L, REED SG, DUTHIE MS. (2013). "Early Revelation of Leprosy in China by Sequential Antibody Analyses with LID-1 and PGL-1". *J Trop Med.* 2013:352689.
- RADA EM, CONVIT J, ULRICH M, GALLINOTO ME, ARANZAZU N. (1987). "Immunosuppression and cellular immunity reactions in leprosy patients treated with a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG". *Int J Lepr* 55(4): 646-650.
- RADA E, SANTAELLA C, ARANZAZU N, CONVIT J. (1991). "Preliminary study of cellular immunity to *Mycobacterium leprae* protein in contacts and leprosy patients". *Int J Lepr* 60 (2): 189-194.
- RADA E, ULRICH M, ARANZAZU N, SANTAELLA C, et al. (1994). "A longitudinal study of immunologic reactivity in leprosy patients treated with immunotherapy". *Int J Lepr* 62 (4): 552-558.
- RADA E, ULRICH M, ARANZAZU N, RODRIGUEZ V, et al. (1997a). "A follow-up study of multibacillary Hansen's disease patients treated with multidrug therapy (MDT) or MDT + Immunotherapy (IMT)". *Int J Lepr* 65(3): 320-327.
- RADA E, ARANZAZU N, CONVIT J. (1997b). "Immunological reaction to mycobacterial proteins in the spectrum of leprosy". *Int J Lepr* 65 (4): 497-500.
- RADA E, DUTHIE MS, REED SG, ARANZAZU N, CONVIT J, (2012). "Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 90-94.
- RADA SCHLAEFLI E, MESTRE M, ARANZAZU N, MORALES J, SOSA R, GUEVARA JR. (2019). "Respuesta serológica frente a marcadores micobacterianos en una zona hiperendémica de lepra. Venezuela (Años 2008-2011)". *Dermatol Venez* 57(1): 41-50.
- REECE ST, IRETON G, MOHAMATH R, GUDERIAN J, GOTO W, et al. (2006). "ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potencial for diagnosis of leprosy. *Clin and Vacc Immunol* 13: 333-340.
- RIDLEY DS, JOPLING WH. (1966). "Classification of leprosy according to immunity; a five group system". *Int J Lepr* 34(3):255-273.
- RIVOIRE BL, TERLOUW S, GROATHOUSE NA, BRENNAN PJ. (2014). "The challenge of producing skin test antigens with minimal resources suitable for human application against a neglected tropical disease; leprosy". *PLoS Negl Trop Dis* 8(5):1-12.
- RIVOIRE BL, GROATHOUSE NA, TERLOUW S, NEUPANE KD, et al. (2014). "Safety and efficacy assessment of two new leprosy skin test antigens: randomized double blind clinical study" *PLoS Negl Trop Dis* 8(5):1-14.
- SPENCER JS, DUTHIE MS, GELUK A, BALAGON MF, KIM HJ, et al. (2012). "Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy". *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:79-89.
- STEFANI MM. (2008). "Challenges in the post genomic era for the development of tests for leprosy diagnosis". *Rev Soc Bras Med Trop* 41(2): 89-94.
- ULRICH M, CONVIT J, CENTENO M, RADA E. (1986). "Caracterización parcial y evaluación de la activación inmunológica de antígenos solubles de *Mycobacterium leprae*". *Inmunología Clínica, UCV*, p 455-462.
- ULRICH M, SMITH PG, SAMPSON C, ZUNIGA M, et al. (1991). "IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela. Epidemiological observations and prospective study of the risk of leprosy". *Int J Lepr* 59: 405-415.
- VAN HOOIJ A, TION KON FAT EM, RICHARDUS R, VAN DEN EEDEN SJ, et al. (2016). "Quantitative lateral flow strip

assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy” *Sci Rep* 29(6): 1-10.

VAN HOOIJ A, TJON KON FAT EM, BATISTA DA SILVA M, CARVALHO BOUTH R, et al. (2018). “Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia”. *Sci Rep* 8(1): 1-9.

VAN HOOIJ A, VAN DEN EEDEN S, RICHARDUS R, TJON KON FAT E, et al. (2019). “Application of new host biomarker profiles in quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field”. *EBioMedicine* 47:301-308.

VISSA VD, BRENNAN PJ. (2001). “The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set”. *Gen Biol* 2(8):1-8.

WHO. (2000). “Guide to elimination of leprosy as a public health problem. 1st Ed. Geneva.

WHO. (2018). “Directrices para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la lepra”. p. 1-89. [Internet]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/guidelines-diagnosis-treatment-and-prevention-leprosy>.