

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sorologia na Hanseníase: comparação de três testes
imunológicos para o diagnóstico da doença e de infecção
subclínica

Luciano Caetano do Amaral

Uberlândia - MG
Julho- 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Sorologia na Hanseníase: comparação de três testes
imunológicos para o diagnóstico da doença e de infecção
subclínica

Luciano Caetano do Amaral

Prof^ª. Dra. Isabela Maria Bernardes Goulart
(Orientadora)

Monografia apresentada à coordenação
do Curso de Biologia para obtenção de
grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia - MG
Julho- 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

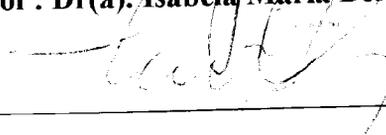
**Sorologia na Hanseníase: comparação de três testes
imunológicos para o diagnóstico da doença e de infecção
subclínica**

Luciano Caetano do Amaral

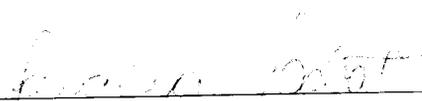
Aprovado Pela Banca Examinadora Em 30/07/2007



Prof. Dr(a). Isabel Maria Bernardes Goulart



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho



Msc. Janaina Lobato

Uberlândia – MG
Julho-2007

Resumo

Em adição a poliquimioterapia, a eliminação da hanseníase necessita de testes específicos e sensíveis que auxiliem o diagnóstico da doença e da infecção subclínica visando diminuir o número de casos novos. Este trabalho objetivou comparar três testes imunológicos, 1 teste de fluxo lateral(ML-FLOW) e 2 testes imunoenzimáticos(ELISA) utilizando dois diferentes antígenos, sintético dissacarídeo ligado em soro albumina bovina (D-BSA) e o nativo fenol glícolípido (PGL-1), específicos para o *Micobacrium leprae*. Os testes foram aplicados em soros de pacientes com hanseníase e seus contatos domiciliares, para a detecção de imunoglobulinas M. Foram analisados 352 amostras de soros, sendo 161 amostras de pacientes e 191 amostras de contatos. Ambos os testes imunológicos analisados demonstraram ser eficientes ferramentas para o auxílio no diagnóstico da hanseníase. O ELISA demonstrou maior sensibilidade tanto para detecção de pacientes e também de contatos domiciliares, sendo observada uma maior eficiência entre os antígenos do antígeno nativo PGL-1, com uma taxa de detecção de 70% entre pacientes e 25% entre contatos domiciliares.

Agradecimentos

Aos meus pais, Ismael Machado do Amaral e Orendina Caetano Rodrigues do Amaral, por terem me apoiado e dado oportunidade de realizar meu curso.

A minha orientadora Isabela Maria Bernardes Goulart que me deu a oportunidade de realizar esse trabalho e aprender um pouco mais.

Ao Luiz Ricardo Goulart Filho agradeço a tudo que me ofereceu, fica minha gratidão.

Aos amigos, em especial do laboratório que me auxiliaram e tiveram paciência, saibam que serei grato por tudo que fizeram por mim.

SUMÁRIO

	páginas
1. Introdução	1
2. Material e métodos	4
3. Resultados e Discussão	8
4. Conclusão	18
5. Referência bibliográfica	19

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) intracelular obrigatório com tropismo por macrófagos e células de Schwann. O parasita penetra pelas vias superiores e demonstra preferência para crescimento em regiões mais frias do corpo como extremidades dos membros e da face, apresenta alta infectividade, mas baixa patogenicidade com período de incubação prolongado (GOULART et al., 2002).

A eliminação da doença foi definida pela Organização Mundial de Saúde como a redução da prevalência para menos de uma pessoa para dez mil habitantes (WHO, 1991). Essa ação se baseava na alta efetividade da Poliquimioterapia (PQT) na redução da infectibilidade dos pacientes, o que gradualmente eliminaria a transmissão e a doença. Até 2006 pôde se observar uma diminuição da prevalência de 20% ao ano nos últimos quatro anos, sendo relatada uma prevalência 219.826 casos até o início de 2006. Entretanto, alguns países como o Brasil ainda possui regiões endêmicas necessitando de uma maior efetividade em ações de controle na hanseníase, podendo ser alcançado com um eficiente diagnóstico inicial e o uso da PQT (WHO, 2007).

A infecção pelo *M. leprae* é caracterizada por uma grande diversificação no curso clínico sendo considerada uma doença polimorfa, a hanseníase demonstra uma ampla apresentação clínica classificada por Ridley e Jopling (RIDLEY & JOPLING, 1966), considerando parâmetros imunopatológicos e de carga bacilar. De acordo com o espectro, os pacientes de hanseníase são classificados apresentando dois pólos estáveis, tuberculóide (T) e virchowiano (V), e entre as formas polares encontram-se as formas instáveis classificadas como dimorfas, sendo estas, dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-dimorfa (DD) e dimorfa-virchowiana (DV) (RIDLEY & JOPLING, 1966). A variedade das formas clínicas é definida por uma vigorosa resposta imune celular no pólo tuberculóide e uma progressiva redução na resposta imune celular em direção ao pólo virchowiano, associada com o aumento na carga bacilar, mais lesões na pele e nervos, e maiores titulações de anticorpos.(GOULART et al., 2002).

Para fins de tratamento, foi adotada a classificação operacional (CO) da Organização Mundial de Saúde que divide os pacientes em Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB) em

concordância com o índice baciloscópio (IB) e pelo número de lesões (WHO, 1982; BRASIL, 2002).

O diagnóstico da hanseníase é clínico e é baseado na apresentação de um dos três principais sinais que são: manchas avermelhadas ou hipopigmentadas com perda de sensibilidade, troncos nervosos espessados e presença de BAAR em esfregaço dérmico ou em amostra de biópsia (WHO, 2000). O exame clínico dermatoneurológico e a baciloscopia ainda são considerados padrão de diagnóstico em hanseníase, e seu resultado é importante para identificar os pacientes de maior carga bacilar e com maior risco de recidivas. Como na coloração de BAAR são necessários no mínimo 100.000 bacilos por grama de tecido para detecção confiável (SHEPARD; McRAE, 1968), em geral só revelam a doença já polarizada e já identificável por suas características clínicas, portanto apresentando a sensibilidade baixa, principalmente em pacientes PB, com características tuberculóides da doença onde os bacilos são raros ou ausentes (YAMASHITA et al., 1996).

Métodos moleculares como reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunológicos como ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), ML-Flow dentre outros são utilizados para auxiliar no diagnóstico e controle da hanseníase, trazendo perspectiva de contribuição na discussão de aspectos diferenciais para reação e recidiva (HARTSKEERL et al., 1989; JOB, et al., 1997; TORRES et al., 2003).

No desenvolvimento do diagnóstico molecular muitos avanços importantes foram feitos. Usando o genoma seqüenciado do *M. leprae*, diversos genes foram identificados para utilização no diagnóstico e monitoramento do tratamento permitindo a implicação da quimioprofilaxia como ação complementar para o controle da hanseníase (VIJAYAKUMARAN et al., 2000; COLE et al., 2001). A PCR apresenta alta especificidade para detecção do *M. leprae* (RAFI et al., 1995; ALMEIDA et al., 2004), no entanto demonstrou baixa sensibilidade no caso de paucibacilares, não discriminando doença passada, ativa ou futura (HARTSKEERL, et al., 1989), pois não podemos distinguir entre DNA amplificado de micobactérias vivas ou mortas (VAN BEERS et al., 1994; GOULART et al., 2001).

No campo imunológico vários métodos foram criados para o estudo de anticorpos específicos, como a reação de fixação do complemento utilizando material de hansenoma (EITER, 1906), radioimunoensaio (MELSOM et al., 1982) e diversas outras técnicas para identificação de moléculas específicas do *M. leprae* têm sido desenvolvidas e aprimoradas.

Atualmente existem diferentes antígenos micobacterianos disponíveis para pesquisa de anticorpos no sangue de pacientes com hanseníase e seus comunicantes (ARAÓZ et al., 2006; SPENCER et al., 2005).

O principal antígeno do *M. leprae* até hoje relatado é o PGL-1, glicolípido fenólico 1, que consiste em um antígeno de superfície pertencente ao grupo dos antígenos frouxamente ligados. Sua extração é possível com solventes do tipo clorofórmio e metanol, sendo uma molécula composta de duas cadeias laterais de ácidos micocerosídeos ligada a uma estrutura trissacarídeo por um radical fenólico. Outras espécies micobacterianas possuem antígenos glicolípidos, mas eles diferem entre si por sua porção carboidrato, que é o determinante antigênico da molécula (HUNTER, et al. 1981; FUJIWARA et al. 1984). A partir do determinante antigênico é possível a produção por síntese química de diferentes antígenos sintéticos, mono, di e trissacarídeo, conjugado com uma proteína carregadora soro albumina bovina (BSA) (FUJIWARA et al. 1984). Entre esses o trissacarídeo (T-BSA) e do dissacarídeo (D-BSA) vem apresentando melhor reatividade em soros com hanseníase.

A técnica imunológica ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) já demonstrou que a produção de anticorpos anti-PGL-1 tem relação com o espectro da hanseníase (YAMASHITA et al., 1996). O principal anticorpo na detecção da hanseníase é a IgM anti-PGL-1 que se encontra em maiores níveis por se tratar de uma doença crônica, refletindo altas concentrações do PGL-1. No sangue periférico a concentração destes anticorpos é grande devida a ativação da resposta humoral que aumenta com o decorrer do tempo devido a multiplicação do bacilo e a dificuldade dos macrófagos na eliminação do antígeno PGL-1 do organismo devido a sua hidrofobicidade (MILER et al., 1987).

Do ponto de vista epidemiológico, é importante determinar o papel da fonte subclínica na transmissibilidade da infecção na população, particularmente no atual contexto de redução da prevalência (VAN BEERS et al., 1999; VISSCHEDIJK et al., 2000;). Torna-se fundamental, nessa etapa de eliminação, aplicar ferramentas laboratoriais que possibilitem detectar a infecção pelo *M. leprae*, identificando a doença na forma inicial ou mesmo auxiliar na classificação tanto operacional como clínica para um melhor tratamento.

Com o objetivo de padronizar um melhor diagnóstico imunológico para detecção de anticorpos IgM de *M. leprae* foram testados o desempenho de dois antígenos no teste ELISA em soros de pacientes e comunicantes: o PGL-1 nativo do *M. leprae*, atualmente um dos mais estudados, e o antígeno dissacarídeo sintético D-BSA, que vem apresentando melhor

resultados em testes sorológicos (CHANTEAU et al., 1988). Foram analisados os índices ELISA (IE) resultantes dos dois antígenos, procurando encontrar melhor desempenho destes, na caracterização dos pacientes em formas clínicas e classificação operacional. Estes IE foram comparados ao índice baciloscópico (IB) dos pacientes e seus respectivos ML-Flow, este consistindo em um teste de fluxo lateral para detecção de IgM em fita, utilizado em campo ainda para investigação científica.(BUHRER et al, 1998). Foram também analisados os resultados dos IE e ML-Flow dos contatos domiciliares dos pacientes com hanseníase, para avaliar a prevalência de infecção subclínica , visando identificar grupos com maior risco de desenvolver a doença.

Como não há prevenção primária, isto é, não há uma vacina específica contra o *M. leprae* e a hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de grande potencial incapacitante, este tipo de estudo torna-se bastante relevante para elucidar os meios de transmissão e infecção do bacilo na população em área endêmica.

2-MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Pacientes, contatos e controles

2.1.1 – Pacientes

Foram utilizadas 161 amostras de soro de pacientes com hanseníase virgem de tratamento de diferentes classificações operacionais e formas clínicas atendidos no Centro de Referência Nacional em Dermatologia Sanitária/ Hanseníase do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (CREDESH/HCU/UFU), em suas duas unidades: Ambulatório Central do Hospital de clínicas de Uberlândia (HCU) e Centro de Saúde-Escola (CSE) HCU – UFU. Os pacientes foram diagnosticados e classificados de acordo com exames clínicos dermatológicos e laboratoriais em formas operacionais (CO) para tratamento e em formas clínicas (FC) de acordo com a classificação de Ridley e Jopling. Das 161 amostras, 13 eram de pacientes T, 35 de pacientes DT-PB, 29 de pacientes DT-MB, 29 de pacientes DD, 21 de pacientes DV e 34 soros de pacientes da forma clínica V.

2.1.2 – Contatos

Foram coletadas 191 amostras de soro de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase (casos índices) de diferentes formas clínicas da hanseníase e classificação operacional, atendidos no CREDESH/HCU/FAMED/UFU, em suas duas unidades: Ambulatório Central do HCU e Centro de Saúde-Escola (CSE) HCU – UFU.

De 191 amostras, obteve-se 28 soros de contatos de pacientes T, 21 soros de contatos de pacientes DT-PB, 25 de contatos de pacientes DT-MB, 41 de contatos de pacientes DD, 31 de contatos de pacientes DV e 41 de contatos de pacientes V.

Contatos sendo considerados pessoas que vivem ou viveram com pacientes nos últimos 5 anos.

2.1.3- Controles

Foram utilizados 20 soros de funcionários do laboratório do CREDESH/HCU/FAMED/UFU, para utilizar como controle negativo. Soros de 10 pacientes com leishmaniose foram coletados e utilizados para verificação de reação cruzada.

2.2- Aspectos Éticos

Este projeto está incluído no projeto temático intitulado “Caracterização Imunológica e Molecular de Pacientes com Hanseníase e seus Comunicantes para Identificação de Grupo de Risco”, que recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa - UFU sob o nº 099/2003 e financiado pela FAPEMIG sob o Convênio CDS800/2004. Os voluntários assinaram um Termo de Consentimento Esclarecido, no qual concordaram em participar da pesquisa e poderiam desistir de fazê-lo a qualquer momento, sem prejuízo próprio.

2.3-Protocolo para coleta de sangue periférico e obtenção de soro

De acordo com o protocolo já utilizado pelo CREDESH/HCU/UFU a coleta de sangue em pacientes e contatos consistiu na assepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%,

seguida por punção da veia braquial com sistema Vacutainer, com coleta de um tubo de 8ml de sangue venoso periférico, após a coleta o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 5000rpm para a separação do soro que é armazenado no freezer a -20°C.

2.4- Antígenos

Ambos os antígenos, nativo PGL-1 e sintético D-BSA, utilizados no trabalho foram gentilmente doados pelo Ph.D. John S. Spencer do Departamento de Microbiologia, Imunológica e Patologia do Colégio de Medicina Veterinária e Ciências Biomédicas da Universidade do Estado do Colorado dos Estados Unidos.

2.5-Otimização do protocolo ELISA para pesquisa e detecção de anticorpos IgM anti PGI-1 do *M. leprae*

Ambos os testes ELISAs foram otimizados procurando estabelecer uma melhor especificidade e sensibilidade para auxiliar no diagnóstico da hanseníase e classificação dos pacientes tanto operacional e em forma clínica. O protocolo para o ELISA indireto utilizando o antígeno PGL-1 nativo segue o descrito por Young 1983, e para o ELISA indireto com o antígeno sintético será segundo Fujiwara 1984, ambos com algumas modificações.

Para o ELISA com o PGL-1 (ELISA PGL-1) e D-BSA (ELISA D-BSA) as microplacas (maxisorp, NUNC) foram sensibilizadas com o antígeno na concentração de 10µg/ml de PGL-1 diluído em etanol absoluto sendo colocado 50µl por poço e deixado até evaporar (ELISA PGL-1) e de 0,1µg/ml de D-BSA diluído em tampão de Fosfato de Sódio (PBS) incubadas por 18 horas à 37° C e após incubação foram lavadas duas vezes com PBS 1X (ELISA-D-BSA). Após a sensibilização das placas foram adicionado 300 µL de PBS1X/BSA 1 % para impedir reações inespecíficas .As placas foram lavadas duas vezes com PBS. Amostras de soro foram adicionadas, em duplicatas, na diluição de 1:100 (ELISA PGL-1) e 1:300 (ELISA D-BSA) em PBS/BSA 1%. Após incubação de uma hora à 37°C, as placas foram lavadas seis vezes com PBS. Em seguida foi adicionado o conjugado imunoenzimático Anti IgM humana – peroxidase (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) na diluição de 1:10000 (ELISA PGL-1) e de 1: 2000 (ELISA D-BSA) em PBS/BSA 1%, com incubação de uma hora à 37°C. Após novo ciclo de seis lavagens com PBS, foi adicionado o substrato enzimático o-phenylenediamine dihydrochloride (Sigma Aldrich Co. P.O. St. Louis,

MO, EUA) diluído em água. Após incubação por 10 minutos a temperatura ambiente, a reação foi interrompida com H₂SO₄ 2N. A leitura da densidade óptica (DO) foi obtida em leitora de microplaca (THERMO PLATE, TP-READER) em comprimento de onda de 492nm. Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa. O *cut off* (limite de positividade) foi determinado pela média dos valores de DO dos soros controles negativos acrescidos de quatro desvios padrões. Os títulos de anticorpos foram expressos arbitrariamente em Índices ELISA (IE), de acordo com a seguinte fórmula $IE = DO_{amostra}/DO_{cut\ off}$ como descrito previamente por Silva e colaboradores (2002). Valores de IE acima de 1.1 foram considerados como resultados positivos.

2.6- Índice Baciloscópico (IB)

O índice bacteriano foi realizado em esfregaços cutâneos de pele dos pacientes no momento do diagnóstico feito e diagnóstico de alta (Ministério da Saúde, 1994). Foram coletados raspados dérmicos de lóbulos direito e esquerdo, cotovelos direito e esquerdo, joelhos direito e esquerdo e 1 ou 2 lesões. A coloração usada para o *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), foi a de Ziehl-Neelsen. O resultado foi registrado de acordo com a Escala Logarítma de Ridley (1990), baseada no número de bacilos vistos em um campo microscópico médio, utilizando-se objetiva de imersão como descrita abaixo:

IB = 0 – nenhum bacilo em 100 campos de imersão

IB = 1 – 1 a 10 bacilos, em média em 100 campos

IB = 2 – 1 a 10 bacilos, em média em 10 campos

IB = 3 – 1 a 10 bacilos, em um campo médio

IB = 4 – 10 a 100 bacilos, em um campo médio

IB = 5 – 100 a 1.000 bacilos, em um campo médio

IB = 6 – acima de 1.000 bacilos, em um campo médio

2.7- Protocolo para Aplicação do Teste de Fluxo Lateral do *M. leprae* (ML-Flow)

As reações do teste de Fluxo Lateral para o *M. leprae* (ML-Flow) foram realizadas através dos testes produzidos pelo KIT Biomedical Research, Amsterdam, Holanda, cedidos pela Organização não governamental (ONG) NLR (Netherlands Leprosy Relief).

O teste consiste na coleta de cinco microlitros de sangue da ponta do dedo indicador que foi diluído em um tampão e colocado em na fita, ML-Flow. A leitura do teste é feita visualmente consistindo em negativo, a não detecção de anticorpos anti-PGL-1 do *M. leprae*, indicado pela ausência da coloração de uma linha, somente sendo corado a linha controle. O resultado positivo é indicado pela presença de outra linha acentuada, a qual varia de +1 a +4 de acordo com o grau de coloração da linha.

2.8-Teste de Mitsuda

O teste foi realizado no momento de diagnóstico do paciente virgem de tratamento, a reação intradérmica foi feita com inoculação de 0,1 da Mitsudina humana, uma suspensão de 6×10^7 bacilos/ mL mortos, produzida pelo Instituto Laura de Souza Lima-Bauru, SP (ILSL-Bauru, SP), realizada na superfície de flexão do antebraço direito, 4 cm abaixo da dobra antecubital, com leitura na 4ª semana, considerando como resultado, a medida do diâmetro da induração local, registrada em milímetros (mm). Utilizando-se os critérios da organização Mundial de Saúde (JOPLING e MCDUGALL, 1991), a reação de Mitsuda foi descrita levando-se em conta os dados relacionados abaixo:

Negativa(-): ausência de reação imunológica a observar e/ou sentir;

Duvidosa(+/-): pápula até 3 mm de diâmetro;

Positivas uma cruz (+): pápula com 4 a 7 mm de diâmetro sem ulceração;

Positivas duas cruzes (++) : pápula com 8 a 10 mm de diâmetro sem ulceração;

Positiva três cruzes (+++) : nódulo maior que 10 mm de diâmetro ou de qualquer tamanho, com ulceração.

2.9-Análise Estatística

Os resultados foram colocados em planilhas do Microsoft Office (programa Microsoft Excel) para cruzamento e comparação das variáveis. A análise estatística foi feita no programa BioStats 3.0 onde foi realizado o teste de concordância de índice Kappa os testes de sensibilidade, especificidade e acuraria.

Resultados e Discussão

Foi analisado um total de 352 amostras de soros, sendo 161 amostras de pacientes virgens de tratamento e 191 amostras de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase. Os pacientes foram divididos de acordo com a classificação operacional (CO) padronizada pela Organização Mundial de Saúde (BRASIL 2002) mais os resultados do ML-Flow, sendo 70% (112/161) MB, entre estes 66% (74/112) são do sexo masculino (Tabela 1), o que representa uma prevalência de formas MB duas vezes maior do que no sexo feminino, concordante com outros trabalhos na literatura (ROCHE et al, 1990; NOORDEEN, 1985).

Tabela 1- Caracterização dos pacientes de acordo com a classificação operacional e sexo.

CO	Sexo				Total	
	Feminino		Masculino		N	%
	N	%	N	%		
MB	38	33,9	74	66,1	112	100
PB	24	49,0	25	51,0	49	100
Total	62	38,5	99	61,5	161	100

Quanto ao índice baciloscópico (IB) do esfregaço dérmico utilizado para o diagnóstico dos pacientes, que avalia a carga bacilar, e o teste de Mitsuda, que avalia a resposta imune celular específica contra o *M. leprae*, foi observado uma correlação crescente entre o IB, com uma ausência de positividade na forma T e a média do IB acima de 4 na forma V, contrastando com a resposta inversa para o teste de Mitsuda, que apresentou resposta fortemente positiva na forma T e total negatividade na V, com um decréscimo gradativo no grupo dimorfo, em direção ao pólo V (Gráfico 1), de acordo com os critérios de classificação de Ridley e Jopling (RIDLEY & JOPLING, 1966).

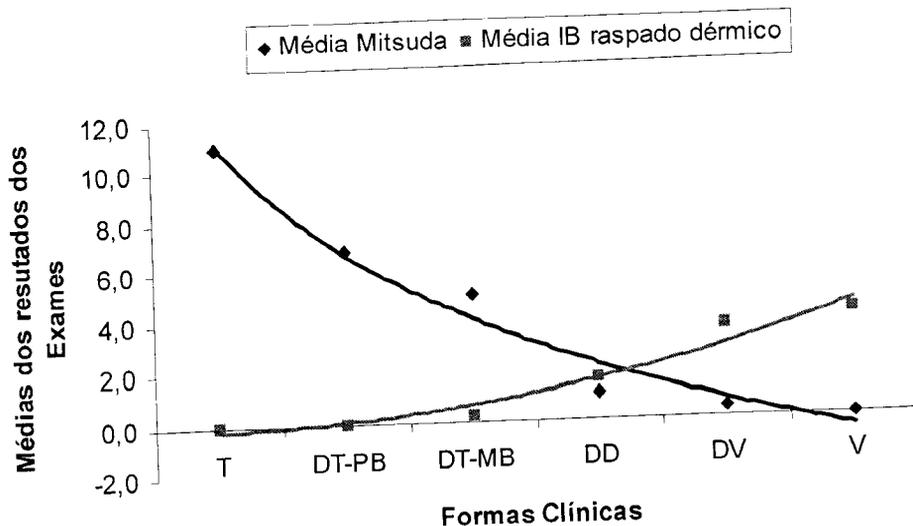


Gráfico 1- Correlação entre as médias do IB de raspado dérmico e médias do teste Mitsuda nos pacientes divididos em forma clínica.

Sobre a resposta humoral por forma clínica utilizando os testes ELISA para os antígenos PGL-1 e D-BSA e o teste de fluxo lateral ML-Flow, as linhas de tendência para os testes demonstraram uma crescente detecção de anticorpos IgM anti *M. leprae* do pólo T para o V (Gráfico 2 e 3), conforme descrito em estudos anteriores (HUNTER, et al. 1981; FUJIWARA et al. 1984; YAMASHITA et al., 1996; BUHRER et al, 1998).

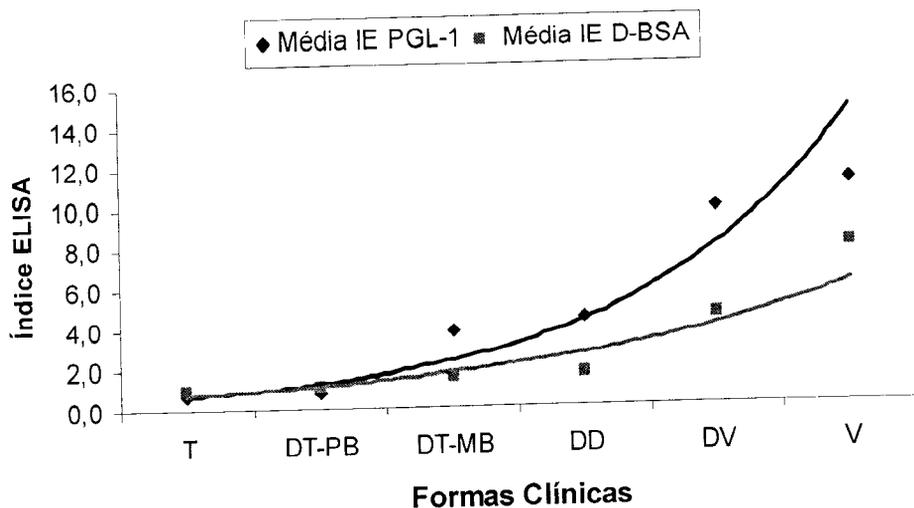


Gráfico 2- Média dos IEs nos ELISAs, PGL-1 e D-BSA, analisados por formas clínicas dos pacientes.

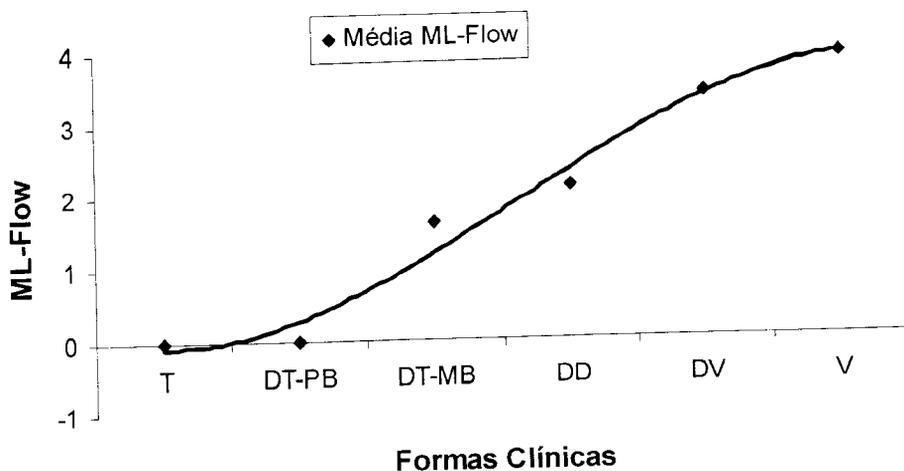


Gráfico 3- Média do ML-Flow dos pacientes analisados por formas clínicas.

As associações entre carga bacilar medida pelo IB do raspado dérmico e resposta humoral detectada pelos três testes imunológicos, ML-Flow e para os Índices ELISA (IE) do PGL-1 e D-BSA, podem ser observadas nos Gráficos 4 e 5, respectivamente. As médias dos respectivos IEs e a média dos resultados semi-quantitativos do ML-Flow comprovam a

relação crescente entre carga bacilar e resposta humoral em pacientes de acordo com trabalhos anteriores. Esses resultados corroboram com os dados já descritos na literatura (HUNTER, et al. 1981; FUJIWARA et al. 1984; CHANTEAU et al., 1988; HARTSKEERL et al., 1989; YAMASHITA et al., 1996; JOB, et al., 1997; BUHRER-SECULA et al., 2000; TORRES et al., 2003), demonstrando a qualidade da padronização dos testes sorológicos reportados no presente estudo.

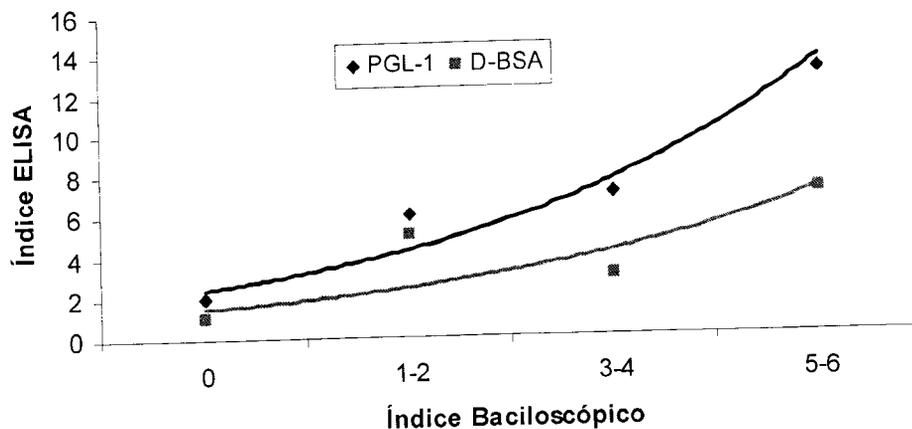


Gráfico 4- Associação entre o IB de raspado dérmico dos pacientes e as médias dos IE dos respectivos pacientes para o ELISA PGL-1 e ELISA D-BSA.

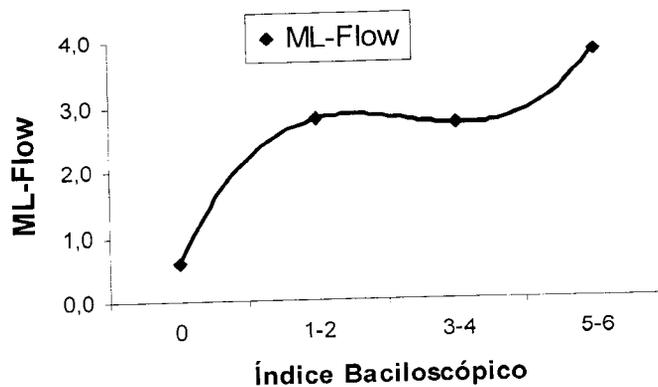


Gráfico 5- Associação entre o IB do Raspado Dérmico dos pacientes e as médias dos resultados de seus respectivos ML-Flow em cruces de 0 a 4 cruces.

Quanto ao teste intradérmico de Mitsuda, que avalia a imunidade celular e sua associação com os testes sorológicos, foi observada uma relação inversa entre as duas respostas imunológicas nos pacientes, isto é, quanto maior a imunidade celular demonstrada pelo teste de Mitsuda, menor os índices ELISA encontrados para os antígenos PGL-1 e D-BSA e o teste de fluxo lateral pelo ML-Flow (Gráficos 6 e 7), esta correlação entre resposta imunológica celular e humoral por forma clínica é encontrado na literatura (OSKAM et al, 2003).

Vale ressaltar que os trabalhos anteriores não relacionam a média dos índices ELISAs por carga bacilar, pela resposta imune celular ou por forma clínica, como apresentado neste estudo, conferindo dessa forma um maior poder de discriminar os IE por forma clínica, auxiliando na classificação dos pacientes no diagnóstico e mesmo possibilitando monitorar a alta terapêutica e recidiva (ROCHE et al, 1990; CHO et al., 2001, RON et al; 2006).

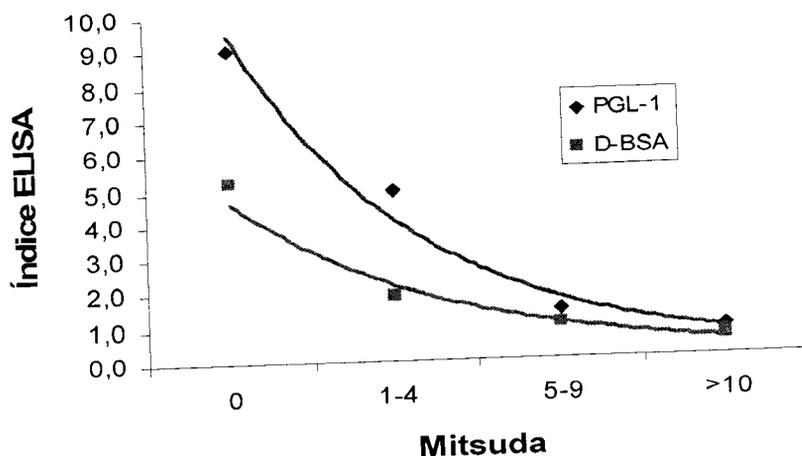


Gráfico 6- Média dos Índices ELISA para os antígenos PGL-1 e D-BSA apresentadas pelos pacientes com hanseníase, segundo resultados do teste de Mitsuda.

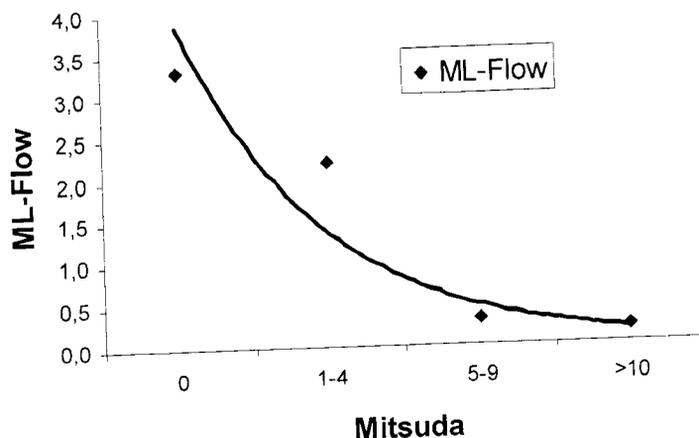


Gráfico 7- Média dos resultados semi-quantitativos (0 a 4 cruzes) do ML-Flow apresentadas pelos pacientes, segundo resultados do teste de Mitsuda.

A detecção de anticorpos IgM contra *M. leprae* no soro dos pacientes pelo ELISA PGL-1 foi de 70% (112/161); pelo ELISA D-BSA foi de 60% (97/161) e pelo ML-Flow 63% (101/161). Considerando que a positividade do IB de raspado dérmico foi de 50% (81/161), pode-se observar que os testes sorológicos foram positivos em 10 a 20% de pacientes nos quais o IB foi negativo, sendo que o ELISA com o antígeno PGL-1 apresentou uma maior

positividade entre os três testes relacionados, mais uma vez concordando com os dados de trabalhos anteriores (CHANTEAU et al., 1988; YAMASHITA et al., 1996; RON et. al, 2006)

Quanto aos resultados dos testes ELISA e a classificação operacional, o ELISA PGL-1 apresentou positividade em 88,3% (99/112) dos pacientes MB e 26,5% (13/49) dos PB; o ELISA D-BSA foi positivo em 73,1% (83/112) dos MB e 28,5% (14/49) dos PB. Para o ML-Flow foi de 89,2% (100 /112) em MB e 2,0% (1/49) em PB. O IB foi positivo em 75% dos MB e 0 % em PB. Esta variação nas taxas de positividade encontrada para esses testes sorológicos do presente trabalho está de acordo com os resultados encontrados na literatura, onde a taxa de detecção para MB varia de 75 a 100% e em PB de 5 a 40% (OSKAM et al, 2003). O teste sorológico ML-Flow não pode ser comparado nesta avaliação, uma vez que ele foi utilizado para a classificação operacional dos pacientes e, portanto a tendência foi apresentar quase 100% de positividade para os MB.

Neste estudo foi encontrado maior detecção em homens, porém as diferenças nas porcentagens de detecção entre os sexos foram baixas, como no ELISA PGL-1 que detectou 70% do sexo masculino e 68% do sexo feminino. Na literatura encontra-se que o sexo feminino apresenta maior resposta imunológica humoral do que o sexo masculino, portanto a taxa de detecção em mulheres tende a ser maior (RON et al, 2006). Outro fato que deve ser levado em consideração é que o número de pacientes MB analisados no estudo eram a maioria do sexo masculino 66% 74/112), e do sexo feminino 34% (38/112). Portanto, não foi possível estabelecer diferenças significativas de níveis de anticorpo anti-PGL-1 nesses grupos quanto ao sexo dos pacientes e positivities dos testes.

A soropositividade dos três testes imunológicos foi comparada em porcentagem de pacientes positivos divididos por forma clínica, (Gráfico 8). A detecção foi de 100% nos pacientes do grupo DV e V nos testes de ML-Flow e ELISA PGL-1. A taxa de detecção dos pacientes aumentou do pólo T em direção ao pólo V nos três testes sorológicos e apenas o ML-Flow apresentou uma ausência de detecção no pólo T.

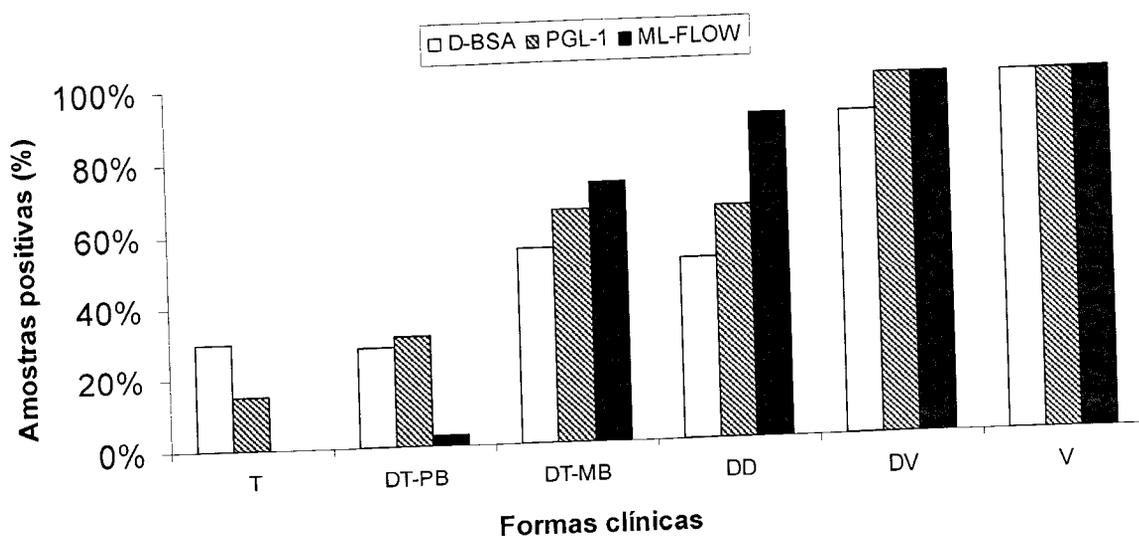


Gráfico 8 - Porcentagem de positividade dos pacientes de acordo com a forma clínica nos três testes sorológicos.

De acordo com os testes, pode-se observar que ambos os ELISA demonstraram um maior potencial para detecção de pacientes nas formas clínicas T e DT-PB, se comparado com o ML-Flow, que apresentou uma detecção de 2,8%(1/35) no grupo DT-PB. Além disso, a utilização dos testes como ferramentas para a detecção de pacientes, em especial os T e DT, o teste ELISA demonstrou uma melhor sensibilidade em ambos os antígenos comparados ao ML-Flow e IB. Tivemos soros em que o ELISA PGL-1 detectou paciente DT com IE de 3,5 e o D-BSA um IE de 2,8, relativamente altos, enquanto que o ML-Flow apresentou resultado negativo. Tal sensibilidade apresentada pelo ELISA é relevante, pois a sorologia é considerada útil no diagnóstico precoce de recidiva (CHIN et al, 1992) e na literatura encontramos estudos que sugerem que pacientes PB com elevados níveis de anticorpos sejam tratados como pacientes MB (DOUGLAS et al, 2004), podendo ser esta uma forma de diminuir ou mesmo evitar casos de recidiva.

Para análise final foram correlacionadas as médias e positividade dos exames laboratoriais convencionais dos pacientes com hanseníase, IB de raspado dérmico e teste de Mitsuda, e dos testes sorológicos ML-Flow e os ELISAs PGL-1 e D-BSA de acordo com a classificação espectral das formas clínicas dos pacientes (RIDLEY & JOPLING, 1966) (Tabela 2). Foi observada uma correlação crescente entre o IB, com uma ausência de positividade na forma T a 100% de positividade na forma V, contrastando com a resposta inversa para o teste de Mitsuda, que apresentou 100% de positividade na forma T e total negatividade na V, com um decréscimo gradativo no grupo dimorfo, em direção ao pólo V,

condizendo com os critérios de classificação de Ridley e Jopling (RIDLEY & JOPLING, 1966). Observou-se ainda uma média do IE para o PGL-1 aumentando proporcionalmente à carga bacilar, em direção ao pólo V, o que não ocorreu para o ELISA DBS-A. O teste ML-Flow não apresentou qualquer positividade para as formas PB, devendo ser ressaltado que este resultado não pode ser comparado com os outros testes sorológicos propostos no presente trabalho, uma vez que a equipe de saúde utilizou o resultado negativo do referido teste para classificar as formas clínicas dos pacientes como formas PB e o resultado positivo para formas MB.

Tabela 2- Resultados dos exames laboratoriais IB, Mitsuda, ELISA PGL-1, ELISA DBS-A e ML-Flow, segundo a classificação das formas clínicas dos pacientes, CREDESH - HCU / FAMED -UFU, 2007.

Exames Laboratoriais	Formas Clínicas					
	T	DT-PB	DT-MB	DD	DV	V
Média MITSUDA	11	6,8	5,0	0,9	0,2	0
Média IB Raspado dérmico	0	0	0,3	1,5	3,6	4,0
Média ML-FLOW	0	0,02	1,6	2,1	3,4	3,9
Média Índice ELISA PGL-1	0,7	0,8	3,8	4,4	9,8	11,1
Média Índice ELISA D-BSA	1,0	1,1	1,5	1,6	4,5	7,9
% Positividade MITSUDA	100	100	54	0	0	0
% Positividade IB Raspado Dérmico	0	0	18	83	100	100
% Positividade ML-FLOW	0	2	72	90	100	100
% Positividade ELISA PGL-1	15	31	65	65	100	100
%Positividade ELISA D-BSA	30	28	55	51	90	100

Dos contatos utilizados 61% (n=118) eram do sexo feminino e 39% (n=73) do sexo masculino e a taxa de idade variou de 3 a 93 anos. Os testes imunológicos quando aplicados em soros de contatos de pacientes apresentaram uma detecção de 25% de contatos no ELISA PGL-1 e 17% para o ELISA D-BSA e no ML-Flow a detecção foi de 10% nos contatos. Os contatos que apresentaram soropositividade nos testes foram analisados quanto à vacinação com BCG e não foi encontrada relação entre contatos soropositivos não vacinados ou vacinados com uma ou duas doses de BCG. De acordo com trabalho anterior. (RON et al, 2006), pessoas com ou sem a cicatriz de BCG tem risco similar de desenvolver soropositividade.

Quando analisados os resultados dos testes em contatos domiciliares dos pacientes classificados operacionalmente, a porcentagem de detecção foi maior em contatos de pacientes MB do que em PB para ambos ELISA. O ML-Flow apresentou semelhança na detecção, 10% tanto em MB como PB (Tabela 3). Na literatura encontra-se uma taxa de soropositividade em contatos domiciliares variando de 7 a 43%, sendo mais alta entre os

contatos de pacientes MB (SOARES et al, 1994), os quais podem apresentar uma possibilidade maior de desenvolver a doença. Estudos têm relatado que a soroprevalência pode ser um indicador de magnitude do problema da hanseníase e que contatos soropositivos devem ser acompanhados como forma de prevenção de infecção subclínica (VAN BEERS et al, 1998; GROATHOUSE et al, 2006), sendo os testes sorológicos eficientes para o acompanhamento de possíveis infecções subclínicas (OSKAM et al, 2003). Com a perspectiva de subsidiar novas estratégias de prevenção e controle da endemia hanseníase, o ELISA, em especial com o antígeno PGL-1, apresentou uma melhor eficiência para tal função devido a maior sensibilidade entre os testes sorológicos na detecção dos contatos de paciente com hanseníase.

Tabela 3-Soropositividade dos três testes sorológicos em contatos domiciliares segundo a classificação operacional do caso índice (pacientes com hanseníase), CREDESH- HCU /FAMED-UFU, 2007.

CO dos casos índices	Contatos N	Positividade	Positividade	Positividade
		ELISA PGL-1 N (%)	ELISA DBS-A N (%)	ML-Flow N (%)
MB	142	39 (27,5)	25 (17,6)	14 (9,8)
PB	49	10 (20,4)	7 (14,3)	5 (10,2)
Total	191	49 (25,7)	32 (16,8)	19 (9,9)

Foi comparado a soropositividade dos pacientes entre os testes imunológicos utilizando coeficiente Kappa para analisar a concordância entre os resultados. Analisamos os resultados entre o ML-Flow e o ELISA D-BSA (Tabela 4). Entre estes dois testes os resultados que apresentaram concordância na positividade foram 49,6% (80/161) e negativos em ambos foram 25,4% (41/161) pacientes, positivos para o ML-Flow e negativos para o D-BSA foram 14,2% (23/161) e 10,8% (17/161) soros foram positivos para o D-BSA e negativos para o ML-Flow. Com estes resultados obtivemos o índice de concordância Kappa que foi de 0,47. Foram feitas as mesmas análises de concordância, porém entre o ML-Flow e PGL-1 (tabela 5) e entre os dois antígenos testados no ELISA (Tabela 6).

Tabela 4- Comparação entre soropositividade de pacientes com hanseníase no ML-Flow e ELISA D-BSA e índice de concordância Kappa

ELISA D-BSA	ML-Flow		Total
	Positivo N	Negativo N	
Positivo	80	17	97
Negativo	23	41	64
Total	103	58	161

Índice Kappa = 0,47 (p < 0,000)

Tabela 5- Comparação entre soropositividade de pacientes com hanseníase no ML-Flow e ELISA PGL-1 e índice de concordância Kappa

ELISA PGL-1	ML-Flow		Total
	Positivo N	Negativo N	
Positivo	98	14	112
Negativo	5	44	49
Total	103	58	161

Índice Kappa = 0,73 (p < 0,000)

Tabela 6- Comparação entre soropositividade de pacientes com hanseníase no ELISA PGL-1 e ELISA D-BSA e índice de concordância Kappa

ELISA D-BSA	ELISA PGL-1		Total
	Positivo N	Negativo N	
Positivo	102	12	114
Negativo	10	37	47
Total	112	49	161

Índice Kappa = 0,67 (p < 0,000)

Dos testes imunológicos os que apresentaram maior concordância foi o ML-Flow e ELISA PGL-1 com um índice Kappa de 0,73, considerado alto de acordo com o grau de concordância para análises de diagnósticos laboratoriais (LANDIS & KOCH, 1977), que pode variar de zero, ou seja nenhuma concordância a uma alta concordância, quanto mais o Kappa se aproxima de 1. O resultado encontrado pode ser explicado devido ao tipo de antígeno utilizado nesses testes ser mais semelhante, pois tanto ML-Flow com ELISA PGL-1 apresentam um antígeno o qual a parte antigênica é composta por um trissacarídeo.

A concordância entre os dois antígenos utilizados no ELISA foi considerada alta, com Kappa de 0,67. Essa correlação se deve ao fato dos ELISAs terem sido otimizados procurando obter melhor sensibilidade e especificidade e os pontos de cortes para positividade dos testes (CUT OFF) terem sido escolhidos para obter uma maior semelhança entre eles (FREY et al, 1998).

Entre o ML-Flow e ELISA D-BSA a concordância foi moderada, apresentando o Kappa de 0,47. Essa menor concordância pode ser resultado da diferença da natureza dos testes: no ML-Flow a detecção de anticorpos ocorre em fase sólida e no ELISA em fase líquida. Outro fator de maior relevância é a diferença entre as partes antigênicas dos antígenos sintéticos utilizados nestes testes, um dissacarídeo ligado ao BSA utilizado no ELISA D-BSA e um trissacarídeo ligado ao BSA que é utilizado no ML-Flow.

Conclusão

O objetivo do estudo foi analisar o desempenho de testes sorológicos para a aplicação no diagnóstico e tratamento da hanseníase.

Pode-se concluir que o teste ELISA, em especial com antígeno nativo PGL-1, apresentou maior sensibilidade tanto em pacientes como em contatos, portanto demonstrou ser uma melhor opção para detecção de possíveis recidivas entre pacientes ou detecção de casos subclínicos entre contatos.

No trabalho realizado, a parte antigênica trissacarídeo (PGL-1) demonstrou ter uma maior sensibilidade do que o dissacarídeo (DBS-A) para detecção de pacientes de hanseníase e contatos, porém o dissacarídeo apresentou a detecção de alguns pacientes não detectados pelo trissacarídeo. .

O ML-Flow demonstrou também ser eficiente na detecção de anticorpos IgM, e por ser um teste de campo rápido, prático e que não necessita de equipamentos sofisticados, sua utilização pode ser de grande importância no combate e controle da hanseníase (BÜHRER-SÉKULA, 2000), principalmente para os serviços de atenção básica, que não têm acesso ao um laboratório de referência para realização do ELISA PGL-1.

Este estudo corroborou com resultados já descritos na literatura como a correlação entre carga bacilar por meio do IB, a resposta imunológica mediada por célula avaliada pelo teste de Mitsuda, e a resposta humoral, medida pelos testes sorológicos apresentados. Pode-se observar que a classificação clínica dos pacientes de acordo com o espectro de Ridley e Jopling ou mesmo a classificação operacional para fins de tratamento podem ser melhoradas com a utilização de testes sorológicos como o ELISA PGL-1 em laboratórios de referência e ML-Flow em campo, cabendo mais estudos para validação desses testes visando monitoramento da alta terapêutica e controle de recidivas em hanseníase.

O presente estudo comparou os antígenos do *M. leprae* utilizados para a detecção de anticorpos IgM específicos para o bacilo no teste ELISA e no teste de fluxo lateral e seus

resultados poderão subsidiar um melhor entendimento da doença e possibilitar o desenvolvimento de novos testes imunológicos para auxiliar no diagnóstico precoce e no controle da hanseníase

3.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. C.; MARTINEZ, N.A.; MANIERO, VC.; SALES, M.A.; DUPPRE, NC.; SARNO, E.N.; SANTOS, A.R.; MORAES, M.O. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase Chain Reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. **Men. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.99, n.5, p.509-5012, 2004.

ARAOZ, R.; HONORE, N.; BANU, S.; DEMANGEL, C.; CISSOKO, Y.; ARAMA, C.; UDDIN, M.; HADI, A.; MONOT, M.; CHO, S.N.; JI, B.; BRENNAN, P.J.; SOW, S.; COLE, S.T. Towards na imunodiagnostic test for leprosy. **Microbes and Infection**, v.8, p.2270-2276, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o controle da hanseníase**. Brasília, 1ªed., 2002.

BUHRER, S.; SMITS, H.; GUSSEHOVEM, G.; INGEN, C.; KLATSER, P.A. Simple Dipstick assay for the Detection of antibodies to phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v.58, n.2, p133-136, 1998.

BUHERR-SECUA, S.; SARNO, E.N.; OSKAM, L.; KOOP, S.; WICHERS, I.; NERY, J.A.; VIEIRA, L.M.. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. **Int. J. Lepr. Other Mycobat. Dis.**; v. 68, n.4, p. 456-463, 2000.

CHANTEAU, S.; CARTEL, J.L.; ROUX, J.; PLICHART, R.; BACH, M.A. Comparison of synthetic antigens for detecting antibodies to phenolic glycolipid 1 in patients with leprosy and their household contacts. **J Infect Dis.**, v.157, p.770-776, 1988.

CHIN-A, L.R.; FABER, W.R.; RENS, M.M. Follow-up of MB leprosy patients after discontinuation of treatment using PGL-1 ELISA are increasing ELISA values indicative of relapse? **Lepr. Rev.**, v, 63, p. 21-27, 1992.

CHO, S.N.; CELLONA, R.V.; VILLAHERMOSA.; FAJARDO, T.T.; BALAGON, M.V.; ABALOS, R.M.; TAN, E.V.; WALSH, G.P.; KIM, J.D.; BRENNAN, P.J. Detection of phenolic glycolipid 1 of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, [S.l.], v.8, n.11, p.138-42, 2001.

COLE, S. T; EIGLMEIER, K.; PARKHILL, J.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; WHEELER, P. R.; HONORÉ, N.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.M.; DEVLIN, K.; DUTHOY, S.; FELTWELL, T.; FRASER, A.; HAMLIN, N.; HOLROYD, N.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; LACROIX, C.; MACLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; QUAIL, M.A; RAJANDREAM, M.A.; RUTHERFORD, K.M.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; SIMON, S.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.R.; BARREL, B.G. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**, [S.l.], v.409, p.1007-1011, 2001

DOUGLAS, J.P.; CELLOMA,R.V.; FAJARDO, T.T.; ABALOS, M.R.; BAGALON, V.M.; KLASTAR, P.R. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. **Clin. Diagn. Lab Immunol.** v. 11, p.897-900, 2004.

EITER, E. Ueber den nachweis von antikörpern im serum eines leprakranken mittels Komplementa blenkunj. **Wien Klin Wochenschr** v.19, p.1555-1557, 1906.

FREY, A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWSKI. A statistically endpoint titer determination method for immunoassay. **Journal of Immunological Methods**, v.221, p.35-41, 1998.

FUJIWARA, T.; HUNTER, S.W.; CHO, S.N.; ASPINALL, G.O.; BRENNAM, P.J. Chemical Synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. **Infect. Immun** v.43, p.245-252, 1984.

- MELSOM, R.; HARBOE, M.; NAAFS, B. Class specific anti- *Mycobacterium leprae* antibody assay in lepromatous (BL-LL) patients during the first two to four years of DDS treatment. **Int. J. Lepr Other Mycobact Dis.**, v.51, p.271-281, 1982.
- MILER, R.A.; GORDER, D.; HARNICSH, J.P. Antibodies to phenolic glycolipid-1 during long long-term therapy: serial measurements in individual patients. **Int. J. Lepr Other Mycobact Dis.**, v.55, p 633-636, 1987.
- MUSHATT, D. M.; WATTANAMANO, P.; ALVARADA, F. B. Lepromatous leprosy in a renal transplant recipient. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.26, p.217-218, 1998.
- NOORDEEN, S. K. The epidemiology of leprosy. IN: HASTINGS, R. C. Leprosy. (Medicine in the tropics series). Churchill Livingstone, New York, NY, USA, 1985. p.15-30
- OSKAM L. **Lepr. Rev.**, v.74, p.196-205, 2003.
- PATROCÍNIO, L.G.; GOULART, I.M.B.; GOULART, L.R.; PATROCÍNIO, J.A.; FERREIRA, F.R.; FLEURY, R.N. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. **FEMS Immunol. Medical Microbiol.**, v. 44, p. 311–316, 2005.
- PATTYN, S. R.; URSI, D.; IEVEN, M.; GRILLONE, S.; RAES, V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the Polymerase Chain Reaction in Nasal swabs of leprosy patients and their contacts. **Int. J. Lepr.**, [S.l.], v.61, n.3, p.389-393, 1993.
- PAYNE, S.N.; DRAPER, P.; REES, R.J.W. Serological activity of purified glycolipid form *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr Other Mycobact Dis.**, v.50, p.220-221, 1982.
- RAFI, A.; DONOGHUE, H.; STANFORD, J. Application of PCR for detection of *M. leprae* DNA in specimens from treat patients. **Int. J. Lepr.**, v.63, p. 42-47, 1995.
- RAMAPRASAD, P. FERNANDO, A.; MADHALE, S.; RAO, J.R.; EDWARD, V.K.; SAMSON, P.D.; KLATSER, P.R.; WIT, M.Y.; SMITH, W.C.; CREE, I.A. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. **Lepr. Rev.**, [S.l.], v. 68, n. 4, p. 301-315, 1997.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system **Int. J. Lepr.**, [S.l.], v.34, p.255-273, 1966.

ROCHE, P.W.; BREITTON, W.J.; BURGESS P. Operational value of serological measurements in multibacillary leprosy patients clinical and bacteriological correlates of antibody responses. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 58, p 480-490, 1990.

RON, P.; SCHURING, F.; JOHANNES M.; DAVID P., JAN H. R.; LINDA O. Association between anti-PGL-I IgM and clinical and demographic parameters in leprosy **Lepr. Rev.**, v.77, p 343-355; 2006.

SAMPAIO, S.; RIVITT, E. **Dermatologia**. São Paulo: Artes, p.484, 1998.

SHEPARD, C. C., McRAE, D. H. A method for counting acid-fast bacteria. **Int. J. Lepr.**, [S.l.], v.36, p.78-82, 1968.

SILVIA, D.A.O; SILVIA, N.M.; MINEO, T.W.P.; PAJUABA NETO, A.A.; FERRO, A.V.; MINEO, J.R. Heterologous antibodies to evaluate the kinetics of the humoral immune response in dogs experimentally infected with *Toxoplasma gondii* RH strain. **Vet. Parasitol.**, v.107.; p181-195, 2002.

SOARES, D.J.; FAILBUS, S.; CHALISE, Y.; KATHET, B. The role of IgM antiphospholipid-1 antibodies in assessing household contacts of leprosy patients in a low endemic area. **Lepr. Rev.**, v.65, p.300-304, 1994.

SPENCER, J.S.; DOCKELL, H.M.; KIM, H.J.; MARQUES, M.A.M.; WILLIAMS, D.L.; MARTINS, M.V.S.B.; MARTINS, M.L.F.; LIMA, M.C.B.S.; SARNO, E.N.; PEREIRA, G.M.B.; MATOS, H.; FONSECA, L.S.; SAMPAIO, E.P.; OTTENOFF, T.H.M.; GELUK, A.; CHO, S.N.; STOKER, N.G.; GOLE, S.T.; BRENNAN, P.J.; PESSOLANI, M.C.V. Identification of Specific Proteins and Peptides in *Mycobacterium leprae* Suitable for the Selective Diagnosis of Leprosy. **The Journal of Immunology**, v.175, p.7930-7938, 2005.

TALHARI, S.; NEVES, R.G. **Hanseníase: dermatologia tropical**. 3. ed. Manaus: Tropical,. p.149, 1997.

TORRES, P.; CAMARENA, J.J.; GOMEZ, J.R.; NOGUEIRA, M.; GIMENO, V.; NAVARRO, J.C.; OLMOS, A. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. **Lepr. Rev.**, [S.l.], v.74, p.18-30, 2003.

VAN BEERS, S M.; IZUMI, S.; MADJID, B.; MAEDA, Y.; DAY, R.; KLATSER, P.R. An epidemiological study of leprosy infection by serology and Polymerase Chain Reaction. **Int. J. Lepr.**, [S.l.], v.62, n.1, p.1-9, 1994.

VAN BEERS, S.M.; HATTA, M.; KLATSER, P.R. Soro-prevalence rates at antibodies to phenolic glycolipid-1 among schoolchildren as indicator of leprosy endemicity In: Van Beers SM. Leprosy epidemiological studies of infection and disease. **Amsterdam**; 1st ed, p. 85-95, 1998.

VAN BEERS, S. M.; HATTA, M. KLATSER, P.R. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for the future control. **Int. J. Lepr.** , [S.l.], v.67, n.2, p.119-128, 1999.

VISSCHEDIJK, J.; BROEK, J.B.; EGGENS, H.; LEVER, P.; BEERS, S.V.; KLATSER, P. Review: *Mycobacterium leprae* – millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. **Trop. Med. Int. Health**, v.5, n.6, p.388-399, 2000.

WORLD HEALTH ASSEMBLY. **Elimination of leprosy**: resolution of the 44th World Health Assembly. WHO, Geneva, 1991. (Resolution No. WHA 44.9)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chemotherapy of leprosy for control programmes**. WHO, Geneva, Technical Report Series, n. 675, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to eliminate leprosy as a public health problem**. Leprosy elimination Group/WHO, Geneva, 1^a.ed, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. <http://www.who.int/lep/en/>, 02/04/2007.

YAMASHITA, J. T.; MAEDA, S.M.; JABUR, R.; ROTTA, O. Artigo de Revisão:
Hanseníase: Novos Métodos e Recursos Diagnósticos. **Anais brasileiros de dermatologia**,
v.71 n.4, p.343-351, 1996.

YOUNG, D.B. and BUCHANAN, T.M. A serological test for leprosy with a glicolipid
specific for *M. leprae*. **Science**, v.221, p.1057-1059, 1983.