MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Adriano Badotti Grassi

HANSENÍASE: COMPARAÇÃO ENTRE TESTES RÁPIDOS COM ANTÍGENO PGL-I EM AMOSTRAS DE SANGUE-TOTAL E SORO

Orientadoras: Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2007
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Adriano Badotti Grassi

HANSENÍASE: COMPARAÇÃO ENTRE TESTES RÁPIDOS COM ANTÍGENO PGL-I EM AMOSTRAS DE SANGUE-TOTAL E SORO

Orientadoras: Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Dissertação submetida ao CPGMT/IPTSP/UFG
como requisito parcial para obtenção do
Grau de Mestre na área de concentração
de Imunologia.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da Heiser Foundation - The Heiser Program for Research in Leprosy and Tuberculosis for IDEAL Consortium/IDEAL – "Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy".

Goiânia-GO, 2007

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por tudo que tenho e sou.

Aos meus pais, Mara Lúcia Badotti Grassi e Jorge Luis da Silva Grassi, por toda força e apoio.

Ao meu Irmão Ricardo, e minha irmã Giovana.

À Profa. Dra. Mariane Martins Araújo Stefani, uma grande mulher, a quem tenho muita admiração. Obrigado, pela confiança, pela extrema paciência que teve comigo, por tudo que me ensinou e pela oportunidade.

Aos meus colegas de laboratório, Ludimila, Alexander Ângela, Regiane, Mônica, Carolina pelo companheirismo, risadas e ajuda quando precisei.

Ao Lucas, parceiro de trabalho que se tornou um grande amigo.

À Dra Celina Martelli, pela grande contribuição.

À Dra Samira Bührer, pela imensa ajuda na reta final desse trabalho.

À Dra Ana Lúcia Maroclo, pela imensa contribuição neste trabalho, alem de tudo que tudo aprender com ela.

À Divina Maria, pela grande ajuda no recrutamento dos pacientes.

Ao Prof. Maurício Barcelos Costa por toda a contribuição na parte histopatológica do projeto.

Aos professores da pós-graduação, por tudo que me ensinaram.

À Ana Maria, pela força no início do meu mestrado.

Ao João Borges Peres Júnior, pela digitação dos dados e aulas de SPSS.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS..... III
SUMÁRIO.....VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....VII
LISTA DAS FIGURAS E TABELAS..... IX
RESUMO..... X
ABSTRACT..... XI
1. INTRODUÇÃO..... 1
1.1. Aspectos Imunológicos da hanseníase 5
1.2. Tratamento da Hanseníase 8
1.3. Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase 8
2. OBJETIVO 13
3. JUSTIFICATIVA 13
4. MATERIAIS E MÉTODOS 14
4.1. Delineamento e População de estudo 14
4.2. Grupos de estudo 14
4.3. Critérios de Inclusão 14
4.4. Critérios de Exclusão 15
4.5. Coleta de dados 15
4.6. Coleta de sangue 16
4.7. Teste Rápido para detecção de anticorpos anti-PGL-I 16
4.7.1. Teste ML-Flow 16
4.7.2. Teste ML-ICA 17
4.7.3. Descrição do teste.....18
4.8. Execução do teste 18
4.8.1. ML-Flow 18
4.8.2. ML-ICA 19
4.9. Análise estatística 20
4.10. Aspectos éticos e financiamento 21
5. RESULTADOS 22

5.1. Características gerais dos participantes 22
5.2. Resumo da soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA em sangue-total e soro 23
5.3. Soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA em sangue total..... 23
5.3.1. Resultados do teste ML-Flow em amostras de sangue total..... 23
5.3.2. Resultados do teste ML-ICA em amostras de sangue total 24
5.4. Soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA em soro 24
5.4.1. Resultados do teste ML-Flow em amostras de soro..... 24
5.4.2. Resultados do teste ML-ICA em amostras de soro..... 25
5.5. Comparação intra-teste: ML-Flow em amostras de sangue-total e soro 26
5.6. Comparação intra-teste: ML-ICA em amostras de sangue-total e soro 26
5.7. Comparação inter-teste: ML-Flow e ML-ICA em amostras de sangue-total ... 27
5.8. Comparação inter-teste: ML-Flow e ML-ICA em amostras de soro 28
6. DISCUSSÃO 30
7. CONCLUSÕES 35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36

LISTA DE ABREVIATURAS

BAAR -	Bacilos Álcool-Ácido-Resistentes
BB -	Hanseníase Borderline Borderline
BCG -	Bacilo Calmette-Guerin
BL -	Hanseníase Borderline Lepromatosa
BSA-	Albumina bovina
BT -	Hanseníase Borderline Tuberculóide
CEP -	Comitês de Ética em Pesquisa
CONEP -	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CRDT-	Centro de Referencia Diagnóstica e Terapêutica
D-BSA-	Dissacarídeo-BSA ()
ELISA -	Imuno ensaio enzimático
FLA-ABS-	Absorção de anticorpos fluorescentes
GO -	Goiás
HIV -	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSA-	Albumina humana
I -	Hanseníase Indeterminada
IB -	Índice baciloscópico
IDEAL-	INITIATIVE FOR DIAGNOSTIC AND EPIDEMIOLOGICAL ASSAYS FOR LEPROSY
IFN-γ	Interferon-γ
IgM -	Imunoglobulina M
IL -	Interleucina
IPTSP -	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
LAM-	Lipoarabinomanana
LL -	Hanseníase Lepromatosa Lepromatosa
LM-	Lipomanana
M. leprae -	Mycobacterium leprae
MB -	Multibacilar

M-O-BSA-	Monossacarídeo –octil-BSA
MS -	Ministério da Saúde
ND-O-BSA-	Natural dissacarideo-octil-BSA
NK-	Natural Killer
NT-P-BSA-	Natural trissacarideo-fenil-BSA
O-	Octil
OMS/WHO -	Organização Mundial da Saúde/World Health Organization
P-	Fenil
PB -	Paucibacilar
PDIMs-	Tiocerol dimicocerosatos
PGL-I -	Antígeno fenoglicolipídeo I do M. leprae
PHA-	Hemaglutinacao passiva
PQT -	Poliquimioterapia
RIA-	Radioimunologico
RR -	Reação Reversa
SPSS -	Statistical Program for Social Science
TGF-	Fator de crescimento e transformação
TT -	Hanseníase Tuberculóide Tuberculóide

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Representação esquemática do envelope do *M. leprae* 2

Figura 2. Estrutura química do antígeno PGL-I do *M. leprae*. 11

Figura 3. Teste ML-Flow 17

Figura 4. Teste ML-ICAB (A). Teste ML-ICAS (B) 17

Figura 5 Modelo esquemático do teste rápido anti-PGL-I 18

Tabela 1. Características gerais dos grupos de pacientes de hanseníase e grupos controles 22

Tabela 2. Resumo da soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA em mostras de sangue-total e soro..... 23

Figura 5. Positividade dos testes em sangue-total ML-Flow (A) e ML-ICA (B). Positividade dos testes em soro ML-Flow (C) e ML-ICA (D) 25

Tabela 3. Concordância entre os resultados do teste ML-Flow em amostras de sangue-total e soro..... 26

Tabela 4. Concordância entre os resultados do teste ML-ICA em amostras de sangue-total e soro..... 27

Tabela 5. Concordância entre os resultados dos testes ML-Flow e ML-ICA em amostras de sangue-total 28

RESUMO

Título: HANSENÍASE: COMPARAÇÃO ENTRE TESTES RÁPIDOS COM ANTÍGENO PGL-I DO EM AMOSTRAS DE SANGUE-TOTAL E SORO.

Objetivos: Este estudo comparou dois testes rápidos para hanseníase que detectam (1) IgM anti-PGL-I (ML-Flow test, KIT, Amsterdam, Holoanda) ou (2) IgM, IgG e IgA anti-PGL-I (ML-ICA, Yonsei University, Coréia do Sul).

Materiais e Métodos: Foram testados sangue-total e soro de pacientes com hanseníase multibacilar (MB; n=50) e paucibacilar (PB; n=48), virgens de tratamento (Centro de Referência em Diagnóstica e Terapêutica, Goiânia, GO), contactantes intradomiciliares de MB (CD; n=35) e indivíduos saudáveis de área endêmica (CS; n=50). Pacientes com hanseníase foram classificados segundo avaliação dermato-neurológica, índice baciloscópico (IB) e exame histopatológico. A mediana da idade foi de 29 anos, 39.9% do sexo masculino. Pacientes MB apresentavam as formas BB-BL-LL (mediana do IB=2.0), Pacientes PB apresentavam as formas TT-BT.

Resultados: (1) Para o grupo MB não observamos diferença significante entre os resultados dos testes ML-Flow em amostras de sangue-total e soro e os resultados do ML-ICA em amostras de soro; (2) Em todos os grupos (MB, PB, CD e CS) que não observamos diferença estatisticamente significativa entres os resultados do ML-Flow em sangue-total ou soro; (3) Entre os pacientes PB o ML-Flow apresentou sensibilidade significativamente maior que o teste ML-ICA, em amostras de sangue-total e em soro; (4) O teste ML-ICA em soro discriminou melhor os pacientes MB e PB.

Conclusão: O teste ML-Flow mostrou-se melhor para utilização em situações de campo que o ML-ICA, pois apresentou alta reatividade em sangue-total em pacientes MB.

Palavras-chave: Hanseníase, sorologia anti-PGL-I, teste-rápido.

Apoio financeiro: The Heiser Program for Research in Leprosy and Tuberculosis for the IDEAL Consortium. (MMA Stefani is a member of IDEAL)

ABSTRACT

Title: COMPARISON BETWEEN TWO RAPID TESTS FOR ANTI PGL-I SEROLOGY IN WHOLE BLOOD AND SERUM.

Objectives: This study compared two leprosy rapid tests detecting (1) IgM against PGL-I (ML-Flow test, KIT, Amsterdam, Netherlands) or (2) IgM, IgG and IgA against PGL-I (ML-ICA, Yonsei University, South Korea).

Methods: Whole blood and serum from untreated multibacillary (MB; n=50) and paucibacillary (PB; n=48) leprosy patients (Reference Center for Diagnosis and Treatment, Goiania, central Brazil), MB household contacts (HHC; n=35) and healthy endemic controls (EC; n=50) were tested. Leprosy patients were classified by dermato-neurological evaluation, bacillary index (BI) and histopathology. Median age was 29 years, 39.9% males. MB patients had BB-BL-LL leprosy (median BI=2.0), PB patients had TT-BT leprosy.

Results: (1) Using sera, ML Flow positivity of MB patients was comparable to ML-ICA positivity. (2) For ML-Flow tests, the positivity was comparable with whole blood and serum. (3) Among PB leprosy ML- flow positiviy was comparable for whole blood and serum but it was higher than the ML-ICA seropositivity in whole blood and serum. (4) Among MB leprosy patients positivity of ML Flow test in serum and whole blood was comparable to the positivity of ML-ICA in serum.

Conclusion: ML-Flow test is more field applicable than ML-ICA since high positivity was observed among MB patients using whole-bood.

Key-words: leprosy, α-PGL-I serology, rapid test.

Funding: The Heiser Program for Research in Leprosy and Tuberculosis for IDEAL Consortium. (MMA Stefani is a member of IDEAL).

2. INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, descrito por Amateur Hansen em 1874 (Lowy & Ridley, 1954). O *M. leprae* uma micobactéria intracelular obrigatória com tropismo para células de Schwann e macrófagos se duplica em temperaturas entre 27 a 30ºC e coloniza as extremidades de seus hospedeiros (Lowy & Ridley, 1954 e Shepard, 1965). Esse bacilo tem taxa de duplicação extremamente lenta em torno de 12 a 21 dias e tem um período de incubação longo, variando entre 2 - 10 anos (Rees et al. 1976).

O *M. leprae* é um bastonete álcool-ácido resistente, quando corado em vermelho pela fucsina não se descora pela lavagem em álcool e ácidos orgânicos (Lowy & Ridley, 1954) Nos esfregaços de pele e nos cortes histopatológicos os bacilos podem ser vistos isolados, em agrupamentos variados ou em arranjos especiais denominados globias (Ridley, 1955).

A membrana plasmática do *M. leprae* é coberta por uma parede celular constituída de peptideoglicanas, galactanas, arabinomananas e ácidos micólicos associados entre si por ligações covalentes. A cápsula do bacilo é composta por grandes quantidades de glicolipídeo fenólico (PGL) e outras moléculas como o tiocerol dimicocerosatos (PDIMs), fosfatidil-inusitol, manosídeos, lipomanana (LM), lipoarabinomananas (LAM) (Figura 1) (Scollard et al. 2006 - revisão).

Acredita-se que o contágio com o *M. leprae* ocorra principalmente pela vias aéreas superiores, mediante eliminação de bacilos por um paciente multibacilar não tratado, que contaminam pessoas susceptíveis (Shepard, 1960; Pedley, 1973). No entanto, outras formas de contágio não podem ser excluídas como: contato direto com lesões de pele ulceradas, urina, fezes, pelo leite materno, suor, secreções vaginas e esperma (Talhari, 1997; Abraham, et al. 1998; Sampaio & Rivitti, 1998). O contágio depende de um contato íntimo e prolongado, geralmente de familiares que moram na mesma residência (Brown, 1959). Apesar da alta infectividade do *M. leprae,* nem todos os expostos desenvolvem a doença e a susceptibilidade depende da capacidade do indivíduo desenvolver resposta imune protetora contra o bacilo. Na grande maioria dos casos o indivíduo infectado desenvolve uma resposta celular eficaz sem surgimento de sinais e os sintomas clínicos não chegam a

aparecer, constituindo uma infecção subclínica ou cura espontânea (Visschedijk et al. 2000).

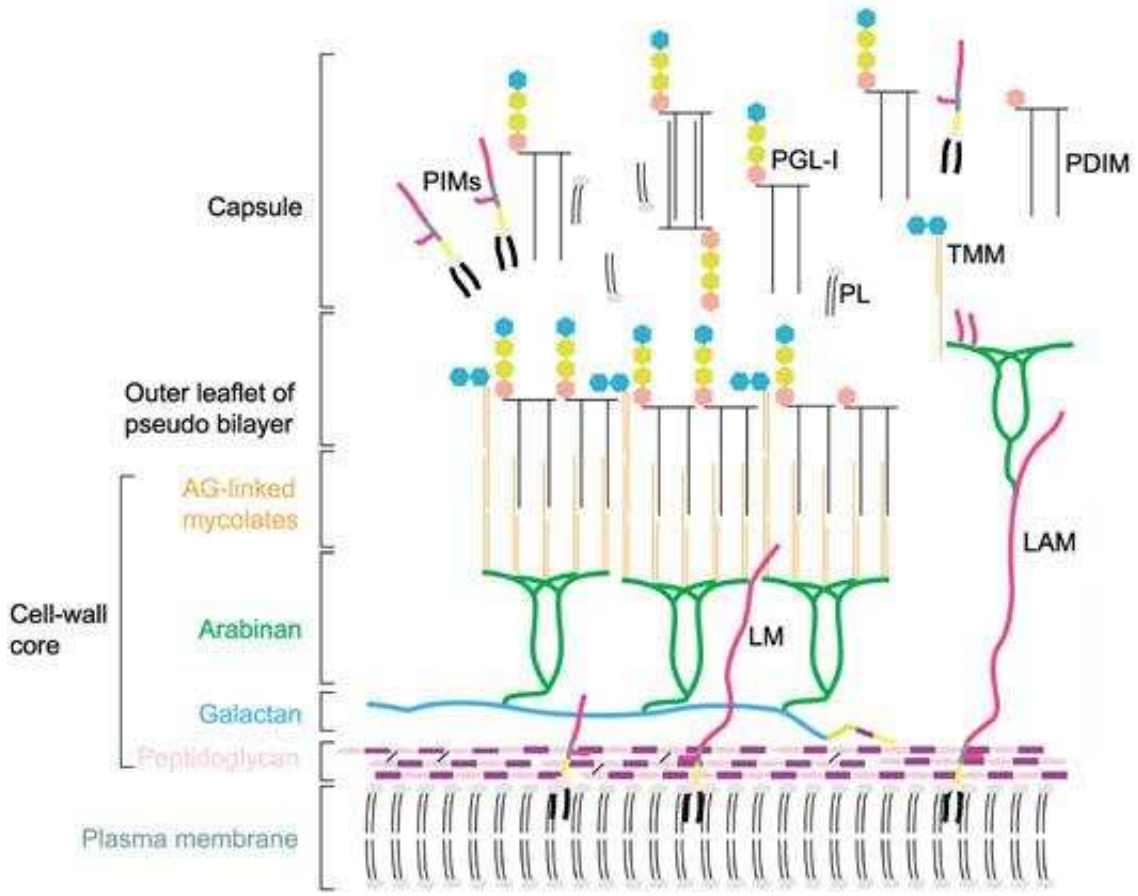

Figura 1. Representação esquemática do envelope do *M. leprae.* Fonte: Scollard et al. 2006. glicolipídeo fenólico (PGL), tiocerol dimicocerosatos (PDIMs), lipomanana (LM) lipoarabinomananas (LAM), trialose monomicolato (TMM), fosfatidil-inusitol (PDIM).

Após mais de duas décadas da introdução do tratamento específico denominado poliquimioterapia (PQT) em 1981, a prevalência global de hanseníase apresentou redução em mais de 80% nos últimos anos (Britton & Lokwood, 2004). Na década de 90 a Organização Mundial de Saúde (OMS), estabeleceu como meta a eliminação da hanseníase, definida como a redução da prevalência da doença para menos de 1 caso em cada 10.000 habitantes até o ano 2005 (OMS, 1991 A). Em 1985 foram registrados mais de 5 milhões de casos (OMS, 1991 A). Em 2006, a OMS registrou 259.217 casos, o que indica que a

prevalência mundial de menos de 1 caso de hanseníase/10000 habitantes foi atingida em alguns países (OMS, 2007). No entanto, seis países, Brasil, a República Democrática do Congo, Madagascar, Moçambique, Nepal e Tanzânia, não conseguiram alcançar a meta de eliminação da hanseníase estabelecida pela OMS (Fine, 2006).

No Brasil, a partir de 1991, após a assinatura do Compromisso para a Eliminação da Hanseníase, observou-se uma queda de 60% na prevalência da doença, no entanto, houve um aumento da incidência (MS, 2005). De acordo com o último boletim de 2006 da OMS, foram registrados, no Brasil, 44.436 casos novos de hanseníase, com incidência de 3,21/10.000 habitantes e prevalência de 2,91 (MS 2007, OMS, 2007). Apesar da redução na taxa de prevalência, a hanseníase ainda constitui um problema importante de saúde pública no Brasil (PAHO, 2005). O país apresenta distribuição heterogênea da doença com regiões de hiper endemicidade (regiões norte, e centro oeste), endemicidade muito alta (nordeste) endemicidade média (sudeste e sul) (MS, 2006). No ano de 2006 foram diagnosticados em Goiás 2.989 casos novos de hanseníase e a prevalência foi 7,35/10.000 habitantes (PAHO, 2007; MS, 2007).

Hanseníase é uma doença infecto-contagiosa, de evolução lenta, que se manifesta principalmente através de sinais e sintomas dermato-neurológicos: lesões na pele e nos nervos periféricos, acometendo principalmente os olhos, mãos e pés (Ridley, 1955). O comprometimento dos nervos periféricos é a característica mais marcante da doença, em decorrência da perda da sensibilidade local, lesões em áreas anestésicas podem ser tornar imperceptíveis originando necrose e reabsorção óssea, geralmente das falanges distais dos pés e das mãos (Jopling, 1966). As incapacidades e deformidades características da hanseníase geralmente resultam em diminuição da capacidade de trabalho, limitação da vida social e problemas psicológicos (Sehgal et al. 1977, Pfaltzgraff et al. 1985).

A hanseníase é uma doença espectral que se apresenta sob diferentes manifestações clínicas que dependem da resposta imune do hospedeiro. A classificação Ridley-Jopling é a mais utilizada para fins científicos e é baseada em critérios clínico-histopatológicos. De acordo com Ridley-Jopling a hanseníase pode ser classificada em formas polares: tuberculóide (TT) e lepromatosa (LL) e formas imunologicamente instáveis: Borderline tuberculóide (BT); Borderline-Borderline (BB) e Borderline lepromatosa (BL) (Jopling & Ridley,1962; Ridley & Jopling, 1966). A forma clínica indeterminada (I): representa a

manifestação inicial da doença quando a resposta imune do hospedeiro é insuficientemente diferenciada para permitir classificação. A forma indeterminada pode evoluir para cura espontânea ou desenvolver aspectos de qualquer uma das formas clínicas da doença (Jopling,1959), dependendo da capacidade do hospedeiro em montar uma resposta imune eficaz celular contra o *M. leprae* (Findalay, 1951). As primeiras manifestações da doença são representadas por manchas hipocrômicas ou áreas de pele aparentemente normal que apresentam distúrbios de sensibilidade (Jopling,1959). Algumas vezes pacientes podem desenvolver lesões em nervos periféricos, sem manifestação cutânea, sendo esta manifestação clínicas conhecida como neural pura (Wade, 1955).

A forma clínica tuberculóide-tuberculóide (TT) é representada por poucas lesões cutâneas constituídas por pápulas ou placas bem delimitadas com perda de sensibilidade. Nesses casos há com freqüência comprometimento intenso de troncos nervosos com as conseqüentes alterações sensitivas e motoras. Considera-se a forma TT uma forma não contagiosa. Ao histopatológico, observa-se a formação de granuloma único ou múltiplos granulomas confluentes de células epitelióides, com presença de células de Langhans no centro da lesão. Observa-se também a presença de linfócitos que conferem um halo denso contornando granuloma sem de bacilos detectáveis (Ridley & Jopling, 1966).

A forma clínica Borderline-tuberculóide (BT) é intermediária entre a forma BB dimorfa e a tuberculóide. É caracterizada por lesões cutâneas bem definidas e avermelhadas mais numerosas que na forma TT e pode também apresentar um número maior de troncos nervosos acometidos. Histopatologicamente observa-se a formação de granulomas de células epitelióides, com presença de células gigantes tipo Langhans, contornada de linfócitos, com raros bacilos (Ridley & Jopling, 1966).

A forma clínica Boderline-Borderline (BB) também conhecida como forma dimorfa é caracterizada por maior número de lesões eritematosas com limites mal definidos, ou múltiplas lesões bem definidas. O acometimento dos nervos é geralmente mais extenso e intenso e o número de bacilos encontrados no histopatológico é maior, com células epitelióides difusamente disseminadas próximas ao granuloma e sem manto linfocitário. Células gigantes tipo Langhans e linfócitos são geralmente escassos e difusos (Ridley & Jopling,1966).

A forma clínica Borderline-lepromatosa (BL) é uma forma intermediária entre a BB e a lepromatosa e apresenta numerosas lesões mal delimitadas e eritematosas. No histopatológico, observa-se granuloma composto de macrófagos indiferenciados com numerosos bacilos (Ridley & Jopling, 1966).

A forma clínica Lepromatosa-lepromatosa (LL) é definida por um polimorfismo de lesões com pápulas, tubérculos, nódulos, placas, ulcerações e infiltração difusa da pele. As lesões eritematosas apresentam limites imprecisos. O exame histopatológico apresenta extenso infiltrado de células composto de histiócitos multivacuolados, contendo inúmeros bacilos e citoplasma com grande quantidade de lipídeos, conhecidos como células de Virchow (Bourges, et al. 1966).

8.1. Aspectos Imunológicos da hanseníase

O M. leprae invade o tecido e é fagocitados pelos macrófagos mediante interação dos receptores para o fragmento Fc de IgG (FcγR) e receptores de manose, alem da ativação do sistema complemento pela via alternativa (Pietres et al. 2001 e Schluger et al. 2001). No interior do fagossoma, o *M. leprae* impede a fusão com o lisossoma, evitando assim a destruição do bacilo pelo macrófago (Pieters et al. 2001).

Os macrófagos ativados, na presença do interferon- γ (IFN-γ), aumentam seu poder de fusão do fagossoma ao lisossoma, além de aumentar a expressão de MHC de classe II que apresenta os antígenos da micobactéria as células T iniciando a resposta imune protetora. Porém, o M. leprae possui grandes quantidades de lipídeos de parede celular, entres eles o glicolipídeo fenólico (PGL-I), que são liberados no citoplasma e no meio extracelular impedindo a ativação dos macrófagos pelo IFN-γ e favorecendo a formação do granuloma (Aínsa et al. 2001).

Além dos macrófagos, as células dendríticas também têm um papel importante na apresentação de antígenos do *M. leprae*. As células dendríticas infectadas pelo bacilo aumentam sua capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN-γ, interleucina-1 (IL-1), interleucina (IL-6) e fator de necrose tumoral-α (TNF-α), além de aumentar a produção de interleucina-12 (IL-12) que atua na ativação de células T virgens,

que tem papel crucial na resposta imune antimicrobiana. A IL-12 age nos linfócitos T $CD4^+$ contribuindo para a geração de uma resposta imune do tipo Th1 com produção de IFN-γ e TNF-α, citocinas que ativam a atividade bactericida dos macrófagos (Demangel et al. 2000 e Britton et al. 2000 - revisão).

O tipo de reposta imune celular mediada por células T $CD4^+$ determina a forma clínica da hanseníase (Modlin et al. 1985). A reposta imune celular do tipo Th1 exerce papel fundamental para a proteção e imunopatologia nas infecções por micobactérias (Yamamura et al. 1992; Sieling et al. 1994). A polarização da resposta imune do tipo Th2 caracterizada pela produção de interleucina-4, (IL-4) e interleucina-10 (IL-10) não é eficaz na destruição de bacilos intracelulares, tornando o indivíduo mais susceptível à doença (Yamamura et al. 1995).

Na forma tuberculóide observa-se a imunidade celular eficaz com produção de citocinas do tipo Th1 como: IFN- γ; TNF-α e IL-12. A ação do IFN-γ promove a ativação dos macrófagos que passam a produzir grandes quantidades de IL-12, que atua nas células natural-killer (NK) e nos linfócitos T $CD4^+$, que então a produzem maior quantidade de INF-γ. O macrófago na presença de IL-12, IFN-γ e TNF-α passa a ter seu poder de destruição do bacilo aumentado com a produção de reativos intermediários de oxigênio e de nitrogênio (Yamamura et al. 1991; Ottenhoff et al. 1998). Porém a resposta imune celular gerada também pode ser maléfica para as células adjacentes infectadas ou não. A lesão neural e a perda de sensibilidade são conseqüências imunopatológicas de resposta de tipo Th1. O TNF-α é uma citocina de suma importância para a formação e manutenção do granuloma (Rouch *et al.* 2002; Stefani et al. 2003, Britton et al. 2000 - revisão).

Na forma lepromatosa ocorre uma polarização da resposta imune do tipo Th2, com vigorosa produção de anticorpos (Yamamura *et al.* 1991). Os antígenos PGL-I e lipoarabinomanana (LAM) parecem ter função supressora na ativação dos macrófagos, favorecendo a polarização para resposta do tipo Th2 com a produção de citocinas supressoras como fator de crescimento e transformação- β (TGF-β), a interleucina-10 (IL-10) e a interleucina (IL-4). A IL-10 e a IL-4 exercem papel regulatório da resposta imune celular, inibindo a ativação dos macrófagos, além de diminuírem a expressão de MHC de classe II pelas células apresentadoras de antígeno. O TGF-β é um produto da ativação de monócitos e tem papel imunosuppresor de células T inibindo a produção de IFN-γ e IL-12.

Neste contexto o *M. leprae* se dissemina sem resistência da resposta imune (Sieling 1993; Prigozy et al. 1997; Goulart et al. 2002 revisão; Hashimoto et al. 2002).

Alguns pacientes podem apresentar episódios inflamatórios agudos antes, durante ou após PQT denominados reações hansênicas (Sehgal, 1977; Rijk, et al. 1994). Esses episódios são caracterizados por respostas exageradas do sistema imune frente à infecção pelo *M. leprae* e ocorrerem em 30 a 50% dos pacientes com hanseníase (Becx & Berhe, 1992; Kumar et al. 2004). As reações hansênicas são classificadas em reação do Tipo I Reação Reversa (RR) ou reação do Tipo II Eritema Nodoso Hansênico (ENH). As reações hansênicas podem deixar seqüelas neurológicas irreversíveis se os pacientes não receberem tratamento específico (Sehgal, 1987).

Reação Tipo I ocorre freqüentemente em pacientes paucibacilares e parece estar associada a um aumento abrupto da resposta imune celular contra antígenos do *M. leprae* (Barnetson et al. 1976; Bjoune, 1983). A reação Tipo I é caracterizada pela inflamação das lesões pré-existentes e o surgimento de novas lesões (Godal, et al. 1973; Barnetson et al. 1975). A histopatologia da RR demonstra expansão do granuloma com presença de edema e um influxo de linfócitos (Bhatia et al. 1993). A produção aumentada das citocinas do tipo Th1 provoca aumento da inflamação local e maior lesão tecidual (Sarno et al.1991).

Reação tipo 2 ocorre em pacientes multibacilares e se caracteriza por reação inflamatória sistêmica (van Braekel, et al. 1994; Pocaterra et al. 2006). O ENH pode ocorrer em pacientes não tratados, mas, um percentual expressivo de pacientes em tratamento, pode desenvolver um ou mais episódios (Sehgal, 1977; Rijk, et al. 1994). O ENH se manifesta pelo aparecimento de pápulas, nódulos e placas dolorosas disseminadas pelo corpo inteiro. Além disso, podem ocorrer manifestações sistêmica como febre, mal-estar, linfomegalia, dores articulares, neurites, hepato-esplenomegalia, irites, iridiciclites, orquites, orquiepididimites (Gomez & Garcia, 1950; Jopling, 1970). No ENH podem ocorrer acúmulo de neutrófilos, altas concentrações de proteínas do sistema complemento (Ridley,1960) e baixas concentrações anticorpos anti PGL-I (Schwerer, et al. 1984; Stefani et al. 1998) devido a formação de imune complexos (Wemanbul et al. 1969). A produção aumentada das citocinas IFN-γ , TNF-α , IL-2, IL-6 e a queda nos níveis das citocinas IL-10 e IL-4 parecem favorecer as reações inflamatórias da reação do tipo 2 (Sarno et al. 1991; Moraes et al.1999; Nath et al. 2000).

8.2. Tratamento da Hanseníase

O esquema poliquimioterápico para o tratamento específico da hanseníase tem como princípio a associação de drogas.

Para definições do esquema terapêutico e da duração do mesmo, a OMS propôs um sistema de classificação simplificado.

A. Pacientes Paucibacilares (PB) engloba os pacientes portadores das formas TT e BT é constituído por pacientes que apresentam menos de cinco lesões de pele com ou sem cometimento de um tronco nervoso. Os pacientes PB devem ser tratados durante seis meses com Rifampicina (uma dose mensal de 600mg supervisionada) e Dapsona (uma dose diária de 100mg) (OMS,1991 B).

B. Pacientes Multibacilares (MB) inclui as formas clínicas BB, BL e LL é representado por pacientes que apresentam 5 ou mais lesões de pele com ou sem acometimento de mais de um tronco nervoso. Os pacientes MB deverm ser tratados durante 24 meses com Rifampicina (uma dose mensal de 600mg supervisionada), Dapsona (uma dose diária de 100mg) e Clofazimina (uma dose mensal de 300mg supervisionada e uma dose diária de 50mg) (OMS,1991 B).

8.3. Diagnóstico clínico e laboratorial da hanseníase

O diagnóstico de hanseníase se baseia principalmente nos sinais clínicos dermato-neurológicos (OMS, 2000). A hanseníase é a única doença de pele na qual ocorre perda de sensibilidade tátil, térmica ou dolorosa, pois o bacilo infecta células de Schwann dos nervos periféricos e a resposta imune inflamatória causa dano neural.

O exame clínico se dá pela inspeção do corpo inteiro do paciente para verificar a presença de lesões características da doença avaliadas quanto a sensibilidade tátil, térmica e

dolorosa. O exame clínico prossegue com inspeção dos olhos, nariz, avaliação da força muscular e pela palpação de troncos de nervosos periféricos (nervos auriculares, ulnares, radiais e tibiais) para se verificar se há ou não espessamento (OMS, 2000; MS, 2001). Além disso, pode ser feita também a avaliação do grau de incapacidade física (GIF) que verifica a sensibilidade protetora dos pés e das mãos (MS, 2002).

O desenvolvimento de métodos laboratoriais de detecção da hanseníase que possam ser utilizados para diagnóstico ou classificação da hanseníase é considerado prioridade em pesquisa (Assep, 2004). A maioria dos testes diagnósticos para doenças infecciosas baseia-se em testes sorológicos. Diferentes técnicas sorológicas para detecção de anticorpos específicos para diagnóstico ou para um acompanhamento durante o tratamento foram descritas (Abe et al. 1980).

A primeira geração de testes sorológicos para a hanseníase surgiu no final da década de 70 início da década de 80. Os primeiros ensaios descritos foram: radioimunoensaio (RIA), o teste de absorção de anticorpos fluorescentes (FLA-ABS) usando o próprio *M. leprae* e a hemaglutinação passiva (PHA) (Abe et al. 1980). Em seguida, ensaios de ELISA "enzyme linked immunosorbent assay" utilizando antígenos puros e proteínas do *M. leprae* foram descritos (Brett et al. 1983; Cho et al. 1983; Aguado et al. 1986; Bach et al. 1986; Hasan et al. 2004). No entanto, esses ensaios em geral apresentam baixa sensibilidade e alto nível de reação cruzada com outras micobactérias (Cho et al. 1984; Brett et al. 1984). A impossibilidade do cultivo in vitro do *M. leprae* impossibilitou a disponibilidade de altas concentrações de antígeno para a realização de estudos sorológicos (Cho eta al 1983, Cho et al. 1984).

O antígeno mais utilizado na sorologia da hanseníase é o glicolipídio fenólico-I (PGL-I), antígeno específico presente na parede celular do *M. leprae* (Brennan et al. 1980). As principais dificuldades para produção de grandes quantidades de PGL-I se devem ao fato do *M. leprae* não ser cultivado *in vitro*, e ao fato da molécula de PGL-I ser extremamente polar requerendo deaciliação, sonicação ou tratamento com detergente para sua produção. Diante disso, derivados antigênicos semi-sintéticos têm sido produzidos para fornecer quantidades suficientes de PGL-I para o desenvolvimento de testes sorológicos (Brett et al. 1983; Cho et al. 1988; Fujiwara et al 1984; Young et al. 1983).

O determinante antigênico da molécula do PGL-I é o trissacarídeo terminal, o 3,6 –di –O - β -D - glicopiranosil –2,3 –di –O –metil –α –L –ramopiranosil –3 –O –metil –α –L - ramopiranosil (Figura 2) (Hunter et al. 1982; Cho et al. 1984; Young et al. 1984; Fujiwara et al. 1984; Chatterjee et al. 1986; Fujiwara et al. 1987; Brett et al. 1986). A porção glicídica do PGL-I sintética é geralmente conjugada a soro-albumina bovina diretamente ou mediante carreadores ramo octil (O) ou fenil (P). Vários neoglicídeos foram produzidos para testagem: monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo-BSA (D-BSA), dissacarídeo natural-octil-BSA (ND-O-BSA) (Chatterjee et al. 1986) e o trissacarídeo natural-fenil-BSA (NT-P-BSA) (Fujiwara et al. 1987).

Devido a natureza glicídica do PGL-I este antígeno estimula a produção predominante de anticorpos da classe IgM (Brennan *et al.* 1980; Brett et al. 1983). Alguns estudos indicam produção de outras classes de imunoglobulinas em menor concentração como a IgG (Cho *et al.* 1988; Levis *et al.* 1994; Stefani *et al.* 1998) e IgA anti-PGL-I (Cree et al. 1988; Saad et al. 1991). Os anticorpos da classe IgM são específicos para o PGL-I, no entanto, os anticorpos da classe IgG anti-PGL-I podem apresentar reação cruzada com outros antígenos em pacientes com tuberculose, em pacientes com doenças autoimunes ou com doenças hepáticas (Kumar et al. 1998).

Os anticorpos da classe IgM anti-PGL-I não apresentam reação cruzada com o *Mycobacterium tuberculosis* nem com nenhuma outra micobactéria conhecida (Cho et al. 1988; Cho et al. 1992). A especificidade da sorologia anti-PGL-I é de 98% e a sensibilidade varia entre 75 a 100% nos casos de pacientes MB e de 14% a 40% nos pacientes PB (Oskam et al. 2003). O teste de ELISA anti-PGL-I é uma técnica bem padronizada e tem sido extensamente avaliado em países endêmicos. Os ensaios mais utilizados para a detecção de anticorpos anti PGL-I são o ELISA, o "dipstick" para detecção rápida e o ensaio de aglutinação (MLPA- "*M. leprae* particle agglutination") (Cho et al. 1988; Chanteau et al. 1991; Bührer-Sékula et al. 1998)

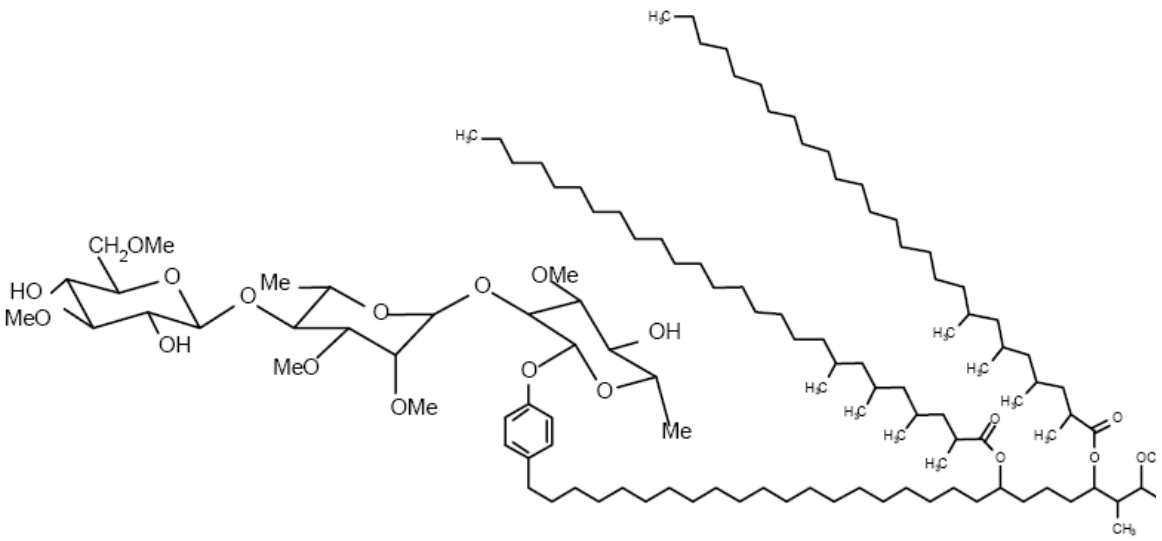

Figura 2. Estrutura química do antígeno PGL-I do *M. leprae*. Fonte: Samira Bührer-Sékula,

Estudos em pacientes multibacilares mostraram que os altos níveis de anticorpos anti-PGL-I estavam correlacionados à alta carga bacilar desses pacientes (Young et al. 1983; Gelber et al. 1989). A soropositividade ao anti-PGL-I é menor em pacientes paucibacilares, pois esses apresentam uma fraca resposta imune humoral, portanto, nesses casos, a sorologia anti-PGL-I não representa uma ferramenta útil ao diagnóstico (Douglas *et al.* 1984; Bührer-Sékula et al. 2000; Oskam et al. 2003)

A sorologia anti-PGL-I pode ser um marcador de infecção ao *M. leprae*, porém não deve ser empregada como teste diagnóstico (Cho et al. 1992; Baumgart et al. 1993). Cho et al. 1992 mostraram alta prevalência de anticorpos IgM anti-PGL-I em contatos intra-domiciliares de MB e controles normais em estudo realizada nas Filipinas, confirmando o achado que a produção de anticorpos IgM anti-PGL-I reflete a carga bacilar. Cho et al. (2001), observaram rápido declínio nos níveis de IgM anti-PGL-I um mês após o início da terapia específica.

A detecção de anticorpos anti PGL-I foi sugerida a ser uma ferramenta útil como preditora de reação tipo I (Roche et al. 1991). Stefani et al. (1998) avaliaram anticorpos anti PGL-I como marcadores prognósticos de reação Tipo 1 e Tipo 2. Porém, correlação positiva foi observada apenas entre os níveis de IgM anti PGL-I e o índice baciloscópico, independente do estado reacional.

De um modo geral, os ensaios sorológicos disponíveis para hanseníase, dentre eles a sorologia anti PGL-I, não devem ser usados para diagnóstico, devido sua baixa sensibilidade em pacientes paucibacilares. Entretanto, estes testes em associação com parâmetros clínicos podem ser úteis na classificação e monitoramento dos pacientes com hanseníase (Bührer-Sékula et al. 2000).

O ELISA é uma técnica fácil de ser executada e amplamente utilizada, requer pessoal treinado, equipamentos específicos e seus reagentes devem ser mantidos refrigerados. Essas condições não são facilmente encontradas em vários países endêmicos. A utilização da sorologia como auxiliar para detecção ou para classificação da hanseníase requer um teste mais simples que o de ELISA (Brett et al. 1986). Teste rápido para a detecção de anticorpos anti PGL-I foi desenvolvido (Bührer-Sékula et al. 1998) mostrou especificidade e sensibilidade semelhantes ao ELISA anti PGL-I tradicional. A execução do teste rápido é fácil, não depende de equipamento especializado e seus reagentes não necessitam de refrigeração (Bührer-Sékula et al. 1998; Bührer-Sékula et al. 2001).

A realização do teste rápido no momento do diagnóstico pode auxiliar na classificação da forma da doença. A combinação do teste rápido com a contagem do número de lesões podem ser úteis para a classificação dos pacientes MB e PB. Bührer-Sékula *et al* 1998 mostraram que a associação entre o exame clínico e a sorologia apresentou significante redução em erros de classificação da hanseníase comparada com a apenas contagem das lesões. Testes rápidos anti-PGL-I no formato "fluxo lateral", denominado ML-Flow, têm sido extensivamente avaliados em vários países endêmicos. Entretanto, visando melhorar a sensibilidade do teste, novas apresentações de testes rápidos anti-PGL-I tem sido propostas.

9. OBJETIVO

Comprar o desempenho de dois testes rápidos distintos para detecção de anticorpos ani-PGL-I em pacientes com hanseníase e em contatos domiciliares utilizando amostras de sangue-total e soro.

10. JUSTIFICATIVA

A hanseníase é uma doença negligenciada que afeta predominantemente países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como o Brasil. O diagnóstico da hanseníase é baseado no exame clínico.

Diagnósticos baseados apenas nos sinais e sintomas clínicos muitas vezes podem ser corretos, no entanto, infecções assintomáticas pelo *M. leprae* ou infecções precoces requerem testes diagnósticos sensíveis e específicos, para prevenir o aparecimento de seqüelas. O desenvolvimento de testes laboratoriais específicos e sensíveis para pacientes com qualquer forma clínica da hanseníase pode contribuir para o diagnóstico e tratamento precoces, e em ultima instância, para a eliminação da doença. Testes diagnósticos rápidos podem ser ferramentas muito úteis para auxiliar na identificação da doença contribuindo para a redução da taxa de incidência da hanseníase no mundo.

Em 2004, uma força tarefa internacional para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase foi estabelecida. Essa força tarefa foi denomidada "IDEAL- Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy". Na qualidade de parceiros dessa iniciativa, esse estudo se propôs a avaliar dois formatos de testes rápidos para a detecção de anticorpos anti-PGL-I do *M. leprae.* Uma versão bem avaliada, o ML-Flow, detecta anticorpos da classe IgM anti-PGL-I em sangue-total e soro, porém apresenta baixa sensibilidade para casos paucibacilares. A outra versão do teste rápido anti-PGL-I, o ML-ICA apresenta kits diferentes para sangue total e soro e detecta anticorpos das classes IgM, IgG e IgA anti-PGL-I. Não existem estudos na literatura sobre o teste ML-ICA e portanto estudos comparativos entre os dois testes são necessários para se definir o teste com melhor desempenho, principalmente para situações de campo.

11. MATERIAIS E MÉTODOS

11.1. Delineamento e População de estudo

Este é um estudo de comparação entre a soropositividade de dois testes rápidos distintos que empregam o antígeno PGL-I em pacientes com hanseníase e controles.

11.2. Grupos de estudo

Quatro grupos de estudo foram avaliados:

a. Pacientes com hanseníase PB;
b. Pacientes com hanseníase MB;
c. Contactantes de pacientes com hanseníase MB;
d. Indivíduos saudáveis de área endêmica sem tuberculose ou hanseníase.

Pacientes com hanseníase paucibacilar (n=48) e multibacilar (n=50), classificados de acordo com Ridley-Jopling, foram recrutados do Centro de Referencia em Diagnostico e Terapêutica da cidade de Goiânia – GO no período de março a novembro de 2006. Os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase multibacilar (n=35) foram visitados em seus domicílios, após autorização do caso índice. O grupo controle constitui-se de indivíduos saudáveis de área endêmica (n=50), estudantes da Universidade Federal de Goiás.

11.3. Critérios de Inclusão:

1. Pacientes com hanseníase recém diagnosticados, virgens de tratamento específicos com exame dermato-neurológico, baciloscopia e histopatológico.

2. Controles saudáveis endêmicos sem qualquer sinal ou sintoma de hanseníase, nem história de contato com pacientes tivesse hanseníase ou com tuberculose.
3. Contactantes domiciliares foram definidos como indivíduos que moram na mesma residência que um caso índice MB por período superior a seis meses.

11.4. Critérios de Exclusão

1. Indivíduos menores de 18 anos.
2. Pacientes com hanseníase em episódio reacional tipo 1 ou tipo 2.
3. Pacientes com hanseníase que possuíam a forma indeterminada da doença.
4. Gestantes.
5. Indivíduo HIV positivo.
6. Indivíduos com: linfoma, leucemia, sarcoidose, estágio avançado de hepatite, doenças renais e infecção fúngica disseminada.
7. Paciente em tratamento com corticosteróide, agentes citotóxicos, inibidores de citocinas e quimioterapia contra câncer.
8. Indivíduos que trabalhem em contato com pacientes com hanseníase foram excluídos do grupo de indivíduos saudáveis de área endêmica.

11.5. Coleta de dados

Os indivíduos com suspeita de hanseníase foram submetidos ao exame dermato-neurológico por dermatologista com ampla experiência em diagnóstico clínico de hanseníase (Drª Ana Lúcia Osório Maroclo de Sousa), no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica (CRDT), em Goiânia-Go. Os pacientes foram examinados quanto à presença de espessamentos de nervos periféricos, características das lesões (número de lesões, localização, tamanho, limites, sensibilidade térmica, dolorosa e tátil) e presença de cicatriz de vacina BCG. Os seguintes exames laboratoriais complementares

foram realizados: baciloscopia com a coleta da linfa de 4 pontos do corpo (lóbulo da orelha, cotovelo, lesão) e biópsia de uma lesão de pele ("punch" estéril, Kolpast, Brasil, 4mm) para exame histopatológico. Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi aplicado um questionário padronizado para coletar informações sócio-demográficas e histórico da saúde do participante e história patológica pregressa.

11.6. Coleta de sangue

Após a assepsia da pele, coletou-se a vácuo uma amostra de 5ml de sangue venoso (Labor Vacuum GEL). Uma gota do sangue-total foi imediatamente utilizada após a coleta para realização dos testes rápidos. O soro foi obtido por centrifugação (Ependorff 5804 R – Hamburgo, Alemanha) a 2000 rpm por 2 minutos e imediatamente utilizado para a realização dos testes rápidos desenvolvidos para amostras de soro.

11.7. Testes rápidos para detecção de anticorpos anti-PGL-I:

11.7.1. Teste ML-Flow

Utilizamos o teste sorológico de fluxo lateral (ML Flow) produzido pelo OmegaTekika Limited Dublin para o KIT (Royal Tropical Institute - Amsterdam, Holanda). O teste ML-Flow utiliza como antígeno o trissacarídeo semi-sintético ligado à albumina de soro bovina (BSA), NT-P-BSA, e detecta anticorpos da classe IgM contra o PGL-1 do *M. leprae*. Uma mesma apresentação pode ser utilizada tanto para amostras e sangue-total quanto de soro (Figura 3).

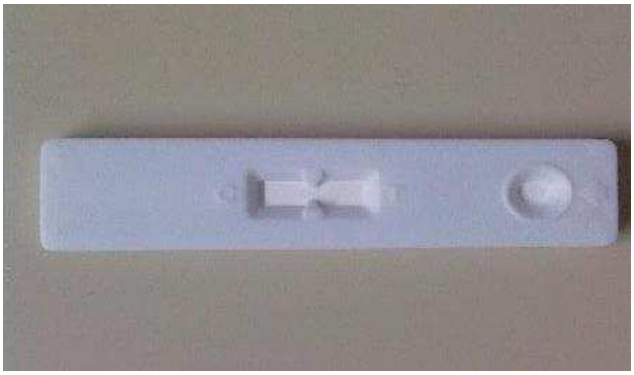

Figura 3. Teste ML-Flow.

11.7.2. Teste ML-ICA

O teste ML-ICA desenvolvido na Universidade de Yonsei/Seul Coréia do Sul é um teste para detecção de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA anti-PGL-I que utiliza como antígeno o dissacarídeo semi-sintético ligado a albumina de soro humano (ND-O-HSA). O ML-ICA foi desenvolvido sob duas apresentações distintas: uma para utilização em amostras de sangue-total (ML-ICA-B) (Figura 4A) e outra para a testagem em amostras de soro (ML-ICA-S) (Figura 4B).

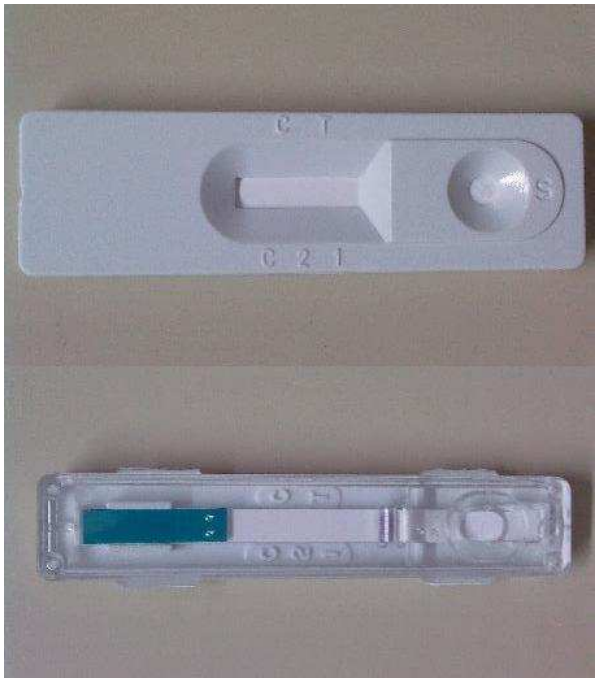

Figura 4. Teste ML-ICAB (A) e teste ML-ICAS (B).

11.7.3. Descrição do teste

A Figura 5 representa um modelo esquemático dos dois testes rápidos avaliados. A Figura 5A mostra um cassete fechado onde visualizamos um orifício para aplicação da amostra e uma janela de leitura do resultado do teste. No interior do cassete há uma tira de plástico que serve de suporte para o papel filtro receptor da amostra, seguido de um outro papel filtro receptor do conjugado. Os constituintes presentes na amostra eluem por uma membrana de nitrocelulose que possui uma linha teste (T) onde está impregnado o antígeno, uma linha controle (C) e um papel absorvente que retém o excesso de líquido (fig. 5B).

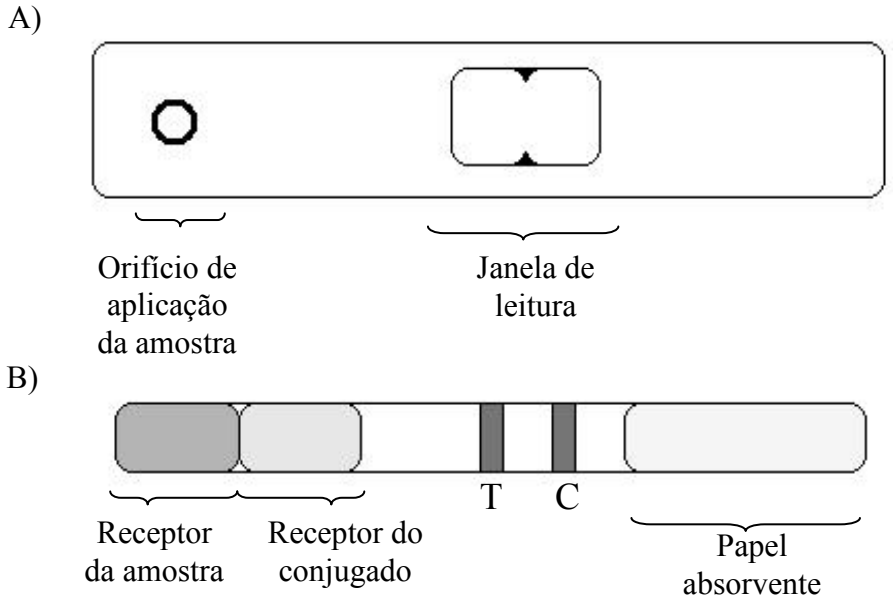

Figura 5. Modelo esquemático do teste rápido anti-PGL-I.

11.8. Execução dos testes

11.8.1. ML-Flow

a. O teste ML-Flow foi realizado seguindo um protocolo de execução do teste. Resumidamente, uma gota (20µL) de sangue total ou 5µL de soro foi

dispensada no orifício de aplicação da amostra. Em seguida adicionaram-se três gotas (130µl) do tampão de corrida (PBS contendo 0.66mg de BSA/mL e 3% Tween 20).

b. Os componentes presentes na amostra, eluem pela membrana de nitrocelulose passando pelo receptor do conjugado. O conjugado constituído de partículas móveis de ouro coloidal associadas à anti-IgM humana, se liga na porção Fc dos anticorpos IgM presentes na amostra. O complexo conjugado-IgM se move através da membrana de nitrocelulose até a zona teste, onde está impregnado o antígeno (NT-P-BSA).

c. Os anticorpos IgM anti-PGL-I associados ao conjugado se ligam ao antígeno e formam uma linha nítida na zona teste (T) nos casos positivos.

d. Na linha controle (C) estão impregnados anticorpos anti-IgM humana, que capturam os anticorpos IgM de qualquer outra especificidade presentes na amostra, formando um linha nítida na zona controle que deve ser sempre reativa validar o resultado.

e. Para amostras de sangue-total a leitura visual foi feita após 5 e após 10 minutos da aplicação do tampão. Para amostras de soro a leitura visual foi realizada após 10 minutos da aplicação do tampão. De acordo com a escala de positividade fornecida pelo fabricante os resultados foram considerados: 0 e 0,5= NEGATIVO; 1+, 2+, 3+ e 4+ = POSITIVO.

11.8.2. ML-ICA

a. Os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. Para testes em sangue-total (ML-ICA-B) uma gota (20µL) da amostra foi dispensada no orifício de aplicação da amostra e seguida da adição de três gotas (90µl) do tampão.

b. Para a testagem em amostras de soro (ML-ICAS) 15µl da amostra e foram diluídos em 135µl da solução tampão. Após homogeneização 100µl dessa solução foram depositados no receptáculo de aplicação da amostra.

c. Os componentes presentes na amostra inclusive os anticorpos, eluem pela membrana de nitrocelulose passando pelo "pad" do reagente. O conjugado constituído de partículas móveis de ouro coloidal associadas à anti-IgM, anti-IgG e anti-IgA humanas, se ligam na da porção Fc dos anticorpos IgM, IgG e IgA presentes na amostra. O complexo conjugado-anticorpo se move através da membrana porosa até a zona teste, onde está impregnado o antígeno (ND-O-HSA).

d. Os anticorpos IgM, IgG e IgA anti-PGL-I associados ao conjugado se ligam ao antígeno e formam uma linha nítida na zona teste (T) para os casos positivos.

e. Na linha controle estão impregnados anticorpos anti-Ig humana que capturam os anticorpos presentes na amostra, formando um linha nítida na zona controle (C), que deve ser sempre reativa para validação do resultado do teste.

f. Para amostras de sangue-total a leitura visual foi feita após 5 e após 10 minutos da aplicação do tampão. Para amostras de soro a leitura visual foi realizada após 10 minutos da aplicação do tampão. De acordo com a escala de positividade fornecida pelo fabricante os resultados foram considerados: 0 e 0,5= NEGATIVO; 1+, 2+, 3+ e 4+ = POSITIVO.

11.9. Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas das variáveis clinicas e epidemiológicas com suas respectivas freqüências. A concordância entre os resultados dos diferentes testes foi calculada por tabulação cruzada com resultado expresso pelo índice kappa (κ), graduado segundo protocolo de Svanholm, no qual se subdividem os resultados do kappa em fraco (0 - 0,5), moderado (0,51-0,75) e excelente (0,76-1).

A correlação entre os resultados foi medida pelo índice de correlação (r), sendo considerado r = 0 ausência de correlação e r = 1 correlação positiva perfeita.

Os gráficos do tipo "Dot Plot" foram utilizados para avaliação da soropositividade ao PGL-I. A análise de dados foi realizada com os programas SPSS (Statistical Package for

Social Sciences, Illinois, Chicago, EUA), versão 13.0 e Graphpad Prism versão 5.0 (Trial version).

11.10. Aspectos éticos e financiamento

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (Anexo 3). Todos os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e sobre os procedimentos envolvidos. Os procedimentos de coleta e análise foram realizados somente após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo coma resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde. Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da Heiser Foundation - The Heiser Program for Research in Leprosy and Tuberculosis for the IDEAL Consortium/IDEAL – "Initiative for Diagnostic and Epidemiological Assays for Leprosy", do qual a Dr[a] Mariane Martins de Araújo Stefani coordenadora desse estudo é membro efetivo.

12. RESULTADOS

12.1. Características gerais dos participantes

Foram incluídos no estudo 183 participantes. A mediana da idade foi de 29 anos (18 – 100 anos), 73/183 (39,9%) participantes eram do sexo masculino. A Tabela 1 mostra as características gerais dos pacientes com hanseníase multibacilar e paucibacilar e dos grupos controles contactantes de MB e indivíduos saudáveis de área endêmica. Todos os pacientes foram classificados segundo critérios clínicos e histopatológicos (Ridley-Jopling). Todos pacientes com hanseníase multibacilar apresentavam IB positivo e foram classificados como formas BB ou BL ou LL. Os pacientes paucibacilares apresentaram baciloscopia negativa e foram classificados como formas TT e BT.

Tabela 1. Características gerais dos grupos de pacientes de hanseníase e grupos controles.

	MB n = 50 (%)	**PB** n = 48 (%)	**CD** n = 35 (%)	**CS** n = 50 (%)
Sexo				
Feminino	19 (38)	28 (58,3)	21 (60)	42 (84)
Idade (anos)				
Mediana (min - max)	48 (23 - 100)	41 (18 - 76)	29 (18 - 76)	20 (18 - 56)
Cicatriz de BCG				
sim	16 (32)	26 (54,2)	19 (54,3)	46 (92)
IB				
neg (0 – 0,5)	-	48 (100)	nr	nr
pos (1.0 – 6.0)	50 (100)	-	nr	nr
N° de lesões de pele				
>5	33 (74)	-	na	na
GIF				
0	31 (62)	46 (95,8)	na	na
1	15 (30)	2 (4,2)	na	na
2	4 (8)	-	na	na
Classificação Ridley-Jopling				
TT	-	19 (39,6)	na	na
BT	-	29 (60,4)	na	na
BB	9 (18)	-	na	na
BL	13 (26)	-	na	na
LL	28 (56)	-	na	na

MB= multibacilar, PB= paucibacilar, CD= contactantes domiciliares de MB, CS= controles saudáveis, GIF= grau de incapacidade física, na = não se aplica, nr= não realizado, IB= índice baciloscópico.

12.2. Resumo da soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA em sangue-total e soro

A Tabela 2 mostra resumidamente a soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA realizados em amostras de sangue-total e soro em pacientes com hanseníase e grupos controles. Os resultados obtidos mostram que não existe diferença estatisticamente significativa entre a positividade do teste ML-Flow em sangue-total e soro e a positividade observada no teste M L-ICA em soro.

Tabela 2. Soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA em sangue-total e soro.

	% Positividade (IC 95%)			
	ML-Flow		**ML-ICA**	
	Sangue-total	**Soro**	**Sangue-total**	**Soro**
MB (n=50)	84,0 (73,0 – 95,o)	94,0 (87,0 – 100)	48,0 (34,0 – 62,0)	90,0 (81,0 – 99,0)
PB (n=48)	31,2 (17,6 – 44,8)	43,7 (29,2 – 58,3)	0	18,8 (7,3 – 30,2)
HHC (n=35)	0	31,4 (15,2 – 47,6)	2,9 (0 – 8,7)	20,0 (6,1 – 33,9)
EC (n=50)	0	2,0 ( )	0	0

MB= pacientes com hanseníase multibacilar, PB= pacientes com hanseníase paucibacilar, CD= contactantes domiciliares de MB, CS= controles saudáveis. IC= intervalo de confiança de 95%.

12.3. Soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICAB em sangue total

12.3.1. Resultados do teste ML-Flow em amostras de sangue total

A Figura 5A mostra os resultados dos testes realizados com o ML-flow em amostras de sangue-total. No grupo de pacientes multibacilares o teste apresentou positividade de 84,0% (42/50). Segundo a escala de positividade, 10 pacientes apresentaram resultados 1+, 16 tiveram resultados 2+, 13 resultado 3+ e 3 pacientes com resultado 4+. Entre os pacientes paucibacilares testados 31,2% (15/48) apresentaram resultados positivos com intensidade de coloração +1. Todos os indivíduos contactantes e

controles saudáveis de área endêmica tiveram resultados negativos para o ML-Flow. Os resultados das leituras realizadas após 5 e 10 minutos não diferiram.

12.3.2. Resultados do teste ML-ICA em amostras de sangue total

A Figura 5B mostra os resultados dos testes realizados com o ML-ICA em amostras de sangue-total. A percentagem de positividade dos resultados do grupo MB foi de 48% (24/50), sendo 11 resultados 1+, 7 pacientes com resultado 2+, 3 apresentaram resultado 3+ e 3 pacientes com resultado 4+. Todos os resultados dos participantes do grupo PB foram negativos para o ML-ICAB. Dentre os resultados obtidos com o grupo CD, um contactante apresentou positividade para o teste ML-ICAB e todos os indivíduos do grupo CS apresentaram resultado negativo. As leituras realizadas após 5 minutos de incubação coincidiram com as leituras realizadas após 10 minutos de incubação.

12.4. Soropositividade dos testes ML-Flow e ML-ICA em soro

12.4.1. Resultados do teste ML-Flow em amostras de soro

A Figura 5C mostra os resultados dos testes realizados com o teste ML-Flow em amostras de soro. O grupo MB apresentou positividade de 94% (47/50), sendo que 8 pacientes tiveram resultado 1+, 8 resultados 2+; 21 pacientes com resultados = 3+ e 10 pacientes com resultados 4+ para o ML-Flow. Entre os pacientes PB, a positividade foi de 43,7% (21/48) sendo 17 com resultado +1, 3 com valor +2 e 1 paciente com resultado +3. O grupo dos contactantes domiciliares apresentou 31,4% (24/35) de positividade e um controle saudável foi soropositivo.

12.4.2. Resultados do teste ML-ICA em amostras de soro

A Figura 5D mostra os resultados do teste ML-ICA em amostras de soro. Entre pacientes com hanseníase multibacilar, 90% (45/48) apresentaram resultados positivos. De acordo com a escala de positividade, 8 pacientes apresentaram resultados 1+, 9 pacientes 2+, 11 com resultado 3+, 17 pacientes com resultado 4+. A positividade no grupo de pacientes paucibacilares foi de 18,8% (9/48), sendo dois pacientes com resultado +1, 6 com resultado +2 e 1 paciente com resultado +4. No grupo dos contactantes domiciliares, 20% (7/35) apresentaram resultados positivos e todos os controles sadios apresentaram sorologia negativa.

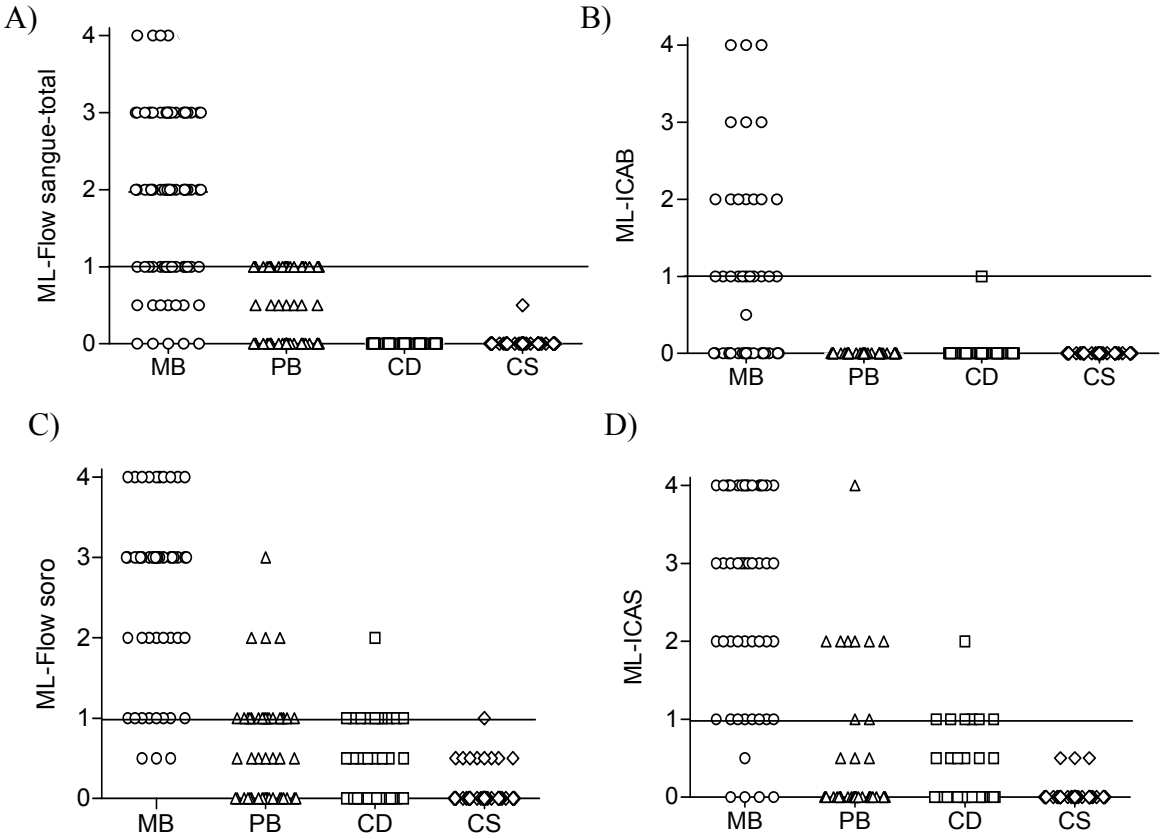

Figura 5. Positividade dos testes em sangue-total ML-Flow (A) e ML-ICA (B). Positividade dos testes em soro ML-Flow (C) e ML-ICA (D). A linha horizontal representa o ponto de corte de positividade.

12.5. Comparação intra-teste: ML-Flow em amostras de sangue-total e soro

Os resultados observados na Tabela 3 mostram uma concordância, de 87,4% entre os resultados dos testes rápidos ML-Flow realizados em amostras de soro e sangue-total, com índice k=0,74, indicando alta concordância.

Tabela 3. Concordância entre os resultados do teste ML-Flow em amostras sangue-total e soro.

	Pares Concordantes (n)		**Pares Discordantes (n)**			
Grupo	**ML-Flow$_S$ +/ ML-Flow$_B$ +**	**ML-Flow$_S$ -/ ML-Flow$_B$ -**	**ML-Flow$_S$ +/ ML-Flow$_B$ -**	**ML-Flow$_S$ -/ ML-Flow$_B$ +**	**Concordância**	**κ**
MB (n=50)	42	3	5	0	0,90	0,50
PB (n=48)	15	27	6	0	0,87	0,74
CD (n=35)	0	24	11	0	0,69	-
CS (n=50)	0	49	1	0	0,98	-
Geral (n=183)	57	103	23	0	0,87	0,74

ML-Flow$_S$= teste realizado com amostras de soro, ML-Flow$_B$= teste realizado com amostras de sangue-total, MB= pacientes multibacilares , PB= pacientes paucibacilares, CD= contactantes domiciliares de MB, CS= controle saudáveis, κ = índice kappa.

12.6. Comparação intra-teste: ML-ICA em amostras de sangue-total e soro

A Tabela 4 mostra a concordância entre os resultados do teste rápido ML-ICA. Os resultados em sangue-total e soro mostraram uma concordância geral de 80,4% e índice k=0,48, indicando baixa concordância.

Tabela 4. Concordância entre os resultados do teste ML-ICA em amostras sangue-total e soro.

	Pares Concordantes (n)		Pares Discordantes (n)			
Grupo	**ML-ICAS + / ML-ICAB +**	**ML-ICAS -/ ML-ICAB -**	**ML-ICAS + / ML-ICAB -**	**ML-ICAS -/ ML-ICAB +**	**Concordância**	**κ**
MB (n=50)	24	5	21	0	0,58	0,18
PB (n=48)	0	39	9	0	0,81	-
CD (n=35)	1	28	6	0	0,83	0,21
CS (n=50)	0	50	0	0	1,0	-
Geral (n=183)	25	122	36	0	0,80	0,48

ML-ICAS= teste realizado com amostras de soro, ML-ICAB= teste realizado com amostras de sangue-total, MB= pacientes multibacilares, PB= pacientes paucibacilares, CD= contactantes domiciliares de MB, CS= controles saudáveis, κ = índice kappa.

12.7. Comparação inter-teste: ML-Flow e ML-ICA em amostras de sangue-total

Os resultados obtidos nos testes realizados em amostras de sangue-total apresentaram uma concordância de 81,4% e índice k=0,48 (Tabela 5). Na análise estratificada, os resultados dos pacientes multibacilares apresentaram concordância de 64%, sendo 48% (24/50) duplo-positivos e 16% (8/50) duplo-negativos, índice k=0,29, indicando uma baixa concordância.

A análise comparativa feita entre a escala de positividade observada pela intensidade de coloração dos testes ML-Flow e ML-ICA em amostras de sangue-total mostrou correlação r =0,73, sendo que os resultados discordantes apresentaram predominantemente valores mais altos para o teste ML-Flow.

Tabela 5. Concordância entre os resultados dos testes ML-Flow e ML-ICA em amostras de sangue total.

	Pares Concordantes (n)		**Pares Discordantes (n)**			
Grupo	**ML-Flow$_B$ + / ML-ICAB +**	**ML-Flow$_B$ -/ ML-ICAB -**	**ML-Flow$_B$ + / ML-ICAB -**	**ML-Flow$_B$ -/ ML-ICAB +**	**Concordância**	**κ**
MB (n=50)	24	8	18	0	0,64	0,29
PB (n=48)	0	33	15	0	0,69	-
CD (n=35)	0	34	0	1	0,97	-
CS (n=50)	0	50	0	0	1,0	-
Geral (n=183)	24	125	33	1	0,81	0,48

ML-Flow$_B$ = teste realizado com amostras de sangue-total, ML-ICAB= teste realizado com amostras de sangue-total, MB= pacientes multibacilares , PB= pacientes paucibacilares , CD= contactantes domiciliares de MB, CS= controles saudáveis, κ=índice kappa.

12.8. Comparação inter-teste: ML-Flow e ML-ICA em amostras de soro

A concordância entre os resultados do testes realizados em amostras de soro foi de 86,3% e com índice k=0,71 (Tabela 6). Na análise estratificada, os resultados concordantes do grupo de pacientes MB foram de 96% (48/50), sendo 90% (45/50) de resultados duplo-positivos e 6% (3/50) de resultados duplo-negativos e índice k=0,73. O grupo de pacientes PB apresentou concordância de 70,9% (34/48) com índice k=0,36. Os resultados dos contactantes de MB apresentaram concordância de 77,2% (27/35) e índice k=0,41. Os resultados do grupo dos controles de indivíduos saudáveis apresentaram 98% (49/50) de resultados duplo-negativos, entre os testes.

Tabela 6. Concordância entre os resultados dos testes ML-Flow e ML-ICA em amostras de soro.

	Pares Concordantes (n)		**Pares Discordantes (n)**			
Grupo	**ML-Flow$_S$ + / ML-ICAS +**	**ML-Flow$_S$ - / ML-ICAS -**	**ML-Flow$_S$ + / ML-ICAS -**	**ML-Flow$_S$ - / ML-ICAS +**	**Concordância**	**κ**
MB (n=50)	45	3	2	0	0,96	0,76
PB (n=48)	8	26	13	1	0,71	0,36
CD (n=35)	5	22	6	2	0,77	0,41
CS (n=50)	0	49	1	0	0,98	-
Geral (n=183)	58	100	22	3	0,86	0,71

ML-Flow$_S$= teste realizado com amostras de soro, ML-ICAS= teste realizado com amostras de sangue-total, MB= pacientes multibacilares , PB= pacientes paucibacilares , CD= contactantes domiciliares de MB, CS= controles saudáveis, κ= índice kappa.

Na análise comparativa realizada levando em conta a escala de positividade observada pela intensidade de coloração dos resultados dos testes ML-Flow e ML-ICA em amostras de soro observamos correlação com r = 0,92.

6. DISCUSSÃO

Existe consenso de que a sorologia anti-PGL-I não deve ser empregada no diagnóstico da hanseníase, entretanto evidências indicam que ela pode ser útil na classificação das formas paucibacilar e multibacilar. Além disso, a sorologia anti-PGL-I pode indicar contactantes domiciliares de pacientes MB que apresentem maior possibilidade de desenvolver a doença (Brennan *et al.* 1983; Brett *et al.* 1983; Oskam *et al.* 2003; Bührer-Sékula *et al.* 2001). A sorologia anti-PGL-I baseia-se na detecção de anticorpos da classe IgM pois a natureza bioquímica do antígeno PGL-I é glicídica associado a um fenolipídeo (Brennan *et al.* 1980). Entretanto, anticorpos das classes IgG e IgA anti-PGL-I foram também descritos (Cho *et al.* 1983; Cree et al. 1988; Saad *et al.* 1991; Stefani *et al.* 1998). O primeiro teste rápido anti-PGL-I (ML-Flow) desenvolvido se baseia na detecção de anticorpos IgM, porém apresentam baixa sensibilidade para pacientes PB. Na tentativa de melhorar a sensibilidade do teste rápido anti-PGL-I uma nova versão denominada ML-ICA foi desenvolvida para a detecção simultânea de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA. Nesse contexto, esse estudo comparou a soropositividade dos testes rápidos para detecção de IgM anti PGLI denominado "ML-Flow", com os resultados do teste rápido para detecção de IgM, IgG e IgA anti-PGL-I denominado "ML-ICA".

Uma comparação realizada entre PGL-I nativo e seus derivados semi-sintéticos mostrou alta correlação entre eles quanto a soropositividade e a absorbância (OD) no ELISA (Brett et al. 1984; Fujiwara et al. 1984; Chanteau et al. 1988). Nosso estudo avaliou o teste ML-Flow que utiliza o trissacarídeo da molécula do PGL- I (NT) e o teste ML-ICA que utiliza como antígeno um dissacarídeo semi-sintético (ND) e em princípio o uso de diferentes apresentações de PGL-I não parece ter influenciado os resultados obtidos.

O ML-Flow utiliza a soroalbumina bovina (BSA) como ligante do NT-P para aumentar sua solubilidade. Como a IgM é uma imunoglobulina que reconhece radicais glicídicos, não deve ocorrer reação cruzada de IgM com a BSA, que tem natureza protéica (Martin, 1969). Entretanto, visando eliminar este risco de reatividade cruzada com antígenos de outra espécie, o teste ML-ICA utiliza o soroalbumina humana (HSA) como

ligante do ND-O para aumentar sua solubilidade. Rodrigues et al. (2003) mostraram que indivíduos com distúrbio autoimune, podem produzir anticorpos da classe IgG anti HSA. Mesmo que os testes comparados tenham empregado diferentes proteínas carreadoras, não existem relatos de que essa diferença possa ter influenciado os resultados observados.

Na comparação intra-teste com ML-Flow empregando diferentes amostras biológicas, sangue-total e soro não observamos diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos estudados, indicando que o teste é bom tanto pra sangue-total quanto para soro. Nossos resultados são concordantes com estudos anteriores sobre sorologia anti-PGL-I que mostraram alta correlação dos resultados em amostras sangue e soro: teste rápido ML-Flow, o teste rápido tipo "dipstick" e ELISA mostraram alta concordância entre resultados obtidos com amostras de sangue-total e soro (Bührer-Sékula et al. 1998; Bührer-Sékula et al. 2001). Em princípio, poderíamos esperar menor sensibilidade do teste em amostras de sangue-total devido à possível interferência de fatores e células do sangue na reação antígeno anticorpo. Apesar de termos observado menor sensibilidade do teste quando utilizamos amostras de sangue-total, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Diferentemente do ML-Flow, a comparação intra-teste do ML-ICA em amostras de sangue-total e soro indicou maior sensibilidade do teste com soro, principalmente no grupo dos pacientes multibacilares. Até o momento, nenhuma publicação relatou o desempenho do teste ML-ICA em sangue-total ou soro.

Na comparação inter-testes ML-Flow e ML-ICA em amostras de sangue-total, o ML-Flow foi significativamente mais sensível para a detecção tanto de pacientes multibacilares quanto de pacientes paucibacilares. O baixo valor do índice kappa na comparação entre os resultados dos dois testes, indicou baixa concordância entre os resultados do ML-FLow e do ML-ICA em amostras de sangue-total. Como esperado para um teste altamente específico, como a sorologia anti-PGL-I, os resultados do grupo de contactantes e de indivíduos saudáveis foram predominantemente negativos, não havendo, portanto diferença significativa entre os dois testes nesses dois grupos controles.

Ao analisarmos os resultados obtidos com ambos os testes em amostras de soro, observamos alto valor de índice kappa indicando uma alta concordância geral. Na análise estratificada por grupo de estudo, os resultados de pacientes multibacilares apresentaram alta positividade, em torno de 90%. Entretanto, a sensibilidade do teste ML-Flow foi significativamente maior nos grupos de pacientes PB, sendo 43,7% versus 18,8% para o ML-ICAS. Bührer-Sékula et al. (2003) mostraram positividade para o teste ML-Flow de 97.4% em pacientes multibacilares e 40% dos paucibacilares. Outro estudo mostrou positividade tanto em pacientes MB quanto em pacientes PB para sorologia anti-PGL-I (Souza, 2002).

O uso de conjugados que detectem simultaneamente anticorpos das classes IgG, IgM e IgA no ML-ICA visou melhorar a sensibilidade desse teste rápido anti-PGL-I. Entretanto, essa versão em sangue-total mostrou em todos os grupos menor sensibilidade que o teste ML-Flow que detecta apenas IgM anti-PGL-I. É possível que na detecção simultânea de anticorpos IgM, IgG e IgA anti-PGL-I possa haver competição ou até inibição da reação a reação antígeno-anticorpo (Parkash, 2004). Outra possibilidade a ser considerada é da existência de problemas técnicos ou de controle de qualidade no teste ML-ICA para sangue-total. Entretanto, quando a versão do teste que detecta anticorpos IgM, IgG e IgA anti-PGL-I foi usada em soro a positividade foi alta, compatível com a do ML-Flow. Outros fatores podem influenciar positividade do teste como a concentração do antígeno impregnado na linha teste, a porosidade da membrana de nitrocelulose, além da distância que separa o receptor da amostra e a linha teste.

A sorologia anti-PGL-I no formato de teste rápido é de fácil execução, não requer refrigeração nem aparelhos e pode ser implementada na rotina ambulatorial para auxiliar na diferenciação de pacientes PB de MB. A correta classificação da doença MB e PB permite a prescrição do regime de MDT adequado (Bührer-Sékula et al. 1998; Bührer-Sékula et al. 2001). Os resultados obtidos nesse estudo mostram que os testes com ML-ICA em soro tiveram alta positividade para os pacientes multibacilares e baixa positividade para os pacientes paucibacilares, e nenhuma reatividade para os grupos de contactantes e de indivíduos saudáveis. De acordo com nossos resultados, o uso do teste rápido que permitiu

melhor classificação da doença, MB e PB, foi o teste ML-ICAS discriminou melhor os pacientes MB dos PB. Estudo anterior mostrou que a associação entre o exame clínico e a sorologia anti-PGL-I levou a uma significante redução no percentual de erros de classificação da hanseníase, quando comparado apenas com a contagem do número de lesões (Bührer-Sékula et al. 2000).

Do ponto de vista operacional, consideramos que o ML-Flow apresenta vantagens sobre o ML-ICA, pois uma única formatação pode ser usada para amostras de sangue-total e soro. Diferentemente o ML-ICA tem duas apresentações distintas, uma para sangue-total e outra para soro, fato que aumenta o custo de produção e dificulta a execução desse teste. O teste ML-Flow vem em embalagens individuais, já o teste ML-ICA para soro vem em embalagens contendo 10 cassetes cada. Uma vez aberta a embalagem, a estabilidade dos testes não utilizados pode ser prejudicada. Além disso, pó ponto de vista prático, a execução do ML-ICA para soro é mais trabalhosa, pois requer diluição prévia em tubo. Já na execução do ML-Flow para soro, a diluição é feita no próprio cassete.

Considerando-se a obtenção de um teste rápido para uso em situações de campo, a utilização de sangue-total oferece vantagens obvias pois é de mais fácil obtenção e execução, podendo ser feito por punção digital no ato da consulta, requer menos manuseio e não necessita de aparelho para sua leitura (TDR, 2006) . O ML-Flow apresentou-se tão sensível em amostras de sangue-total quanto em amostras de soro, indicando que com isso esse teste pode ser usado em situações de campo.

Em resumo, nosso estudo mostrou que:

- Para o grupo MB não foi observada diferença significante entre os resultados do ML-Flow em amostras de sangue-total e soro e os resultados do ML-ICA em amostras de soro;

- Não foi observada diferença significativa entres os resultados do ML-Flow em sangue-total ou soro em nenhum dos grupos testados – MB, PB, CD e CS.

- Entre os pacientes PB, o ML-Flow apresentou sensibilidade significativamente maior que o teste ML-ICA, tanto em amostras de sangue-total quanto em soro;

- O protocolo de execução do teste ML-ICA é mais complexo que o do ML-Flow;

- O teste ML-ICA em soro faz melhor distinção entre os pacientes MB e PB, pois a soropositividade foi concentrada nos pacientes MB.

7. CONCLUSÕES

A Comparação dos resultados dos testes ML-Flow e ML-ICA em pacientes MB indicam que a soropositividade do teste ML-FLow em sangue-total e soro e a soropositividade do teste ML-ICA em amostras de soro são comparáveis. O ML-FLow apresentou maior sensibilidade maior sensibilidade para os pacientes PB, tanto em amostras de sangue-total quanto em amostras de soro. Além disso, operacionalmente, o ML-Flow também apresenta outras vantagens, pois um cassete comum pode ser usado em amostras de sangue-total e soro, diferentemente do ML-ICA que tem duas apresentações distintas, uma para sangue-total e outra para soro, o que aumenta os custos de produção e execução do teste. O kit ML-ICA para amostras de soro requer maior preparo por parte do profissional que realiza o teste, pois exige uma pré-diluição da amostra em tubo, diferentemente do ML-Flow cuja diluição da amostra é feita no próprio cassete. Portanto, concluímos que o kit ML-Flow pode ser usado para auxiliar no diagnóstico e classificação da hanseníase MB e PB e situações de campo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham S, Mozhi NM, Joseph GA, Kurian N, Rao PS, Job CK 1998. Epidemiological significance of first skin lesion in leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 66:131-139

Abe M, Minagawa F, Yoshino Y, Ozawa T, Saikawa K, Saito T 1980. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases Dis*. 48(2):109-19.

Aguado S, G.; Malik, A.; Tougne, C.; Lambert, P.H. & Engers, H.D. 1986. Simplification and standardization of serodiagnostic tests for leprosy based on phenolic glycolipid-I (PGL-I) antigen. *Leprosy Review.*, 57 :83-93.

Aínsa JA, Martín C, Gicquel B 2001. Molecular approaches to tuberculosis. *Moecularl Microbiology.* 42(2):561-70.

Bach MA, Wallach D, Flageul B, Hoffenbach A, Cottenot F. 1986. Antibodies to phenolic glycolipid-1 and to whole Mycobacterium leprae in leprosy patients: evolution during therapy. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases*. 54:256-267.

Barnetson RS, Bjune G, Pearson JM, Kronvall G. 1975. Antigenic heterogeneity in patients with reactions in borderline leprosy. *British Medical Journal*. 22;4:435-437.

Barnetson RS, Bjune G, Pearson JM, Kronvall G. 1976. Cell mediated and humoral immunity in "reversal reactions". *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*. 44:267-274.

Baumgart KW, Britton WJ, Mullins RJ, Basten A, Barnetson RS 1993. Subclinical infection with Mycobacterium leprae--a problem for leprosy control strategies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 87(4):412-5.

Becx-Bleumink, M., and D. Berhe. 1992. Occurrence of reactions, their diagnosis and management in leprosy patients treated with multidrug therapy: experience in the leprosy control program of the All Africa Leprosy and Rehabilitation Training Center(ALERT) in Ethiopia. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*. 60:173–184.

Bhatia VN, Thawani G 1993. Observations on attempted leprosy cultures in two media. *Indian Jouranl Leprosy.* 65(2):163-71

Bjune G. 1983. Reactions in leprosy. *Leprosy Review*. 61-67.

Bourges M, Joyon L, Achard-Vincent J, Malet P, Turchini JP. 1966. On certain infrastructural characteristics of Virchow cells (human lepromatous leprosy). *Annais Dermatology Syphiligrafs.* 93:53-62.

Brennan PJ 1983. The phthiocerol-containing surface lipids of Mycobacterium leprae--a perspective of past and present work. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases Dis.* 51(3):387.

Brennan PJ, Barrow WW 1980. Evidence for species-specific lipid antigens in Mycobacterium leprae. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Diseases* 48(4):382-7.

Brett SJ, Draper P, Payne SN, Rees RJ 1983. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. *Clinical Exp Immunologyl.* 52(2):271-9

Brett SJ, Lowe C, Payne SN, Draper P. 1984. Phenolic glycolipid 1 of *Mycobacterium leprae* causes nonspecific inflammation but has no effect on cell-mediated responses in mice. *Infection Immunology.* 46(3):802-8.

Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R 1986. Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. *Clinical Exp Immunology.* 64(3):476-83.

Britton WJ, Lockwood DN. 2004. *Leprosy. Lancet*. 363:1209-1219.

Britton WJ, Martin E, Kamath AT, Neupane KD, Roche PW 2000. Immunoprophylaxis against Mycobacterium leprae infection with subunit vaccines. *Leprpsy Review.* 71 Suppl:S176-81.

Brown JA. 1959. Factors influencing the transmission of leprosy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* ;53:179-189.

Bührer-Sekula S, Cunha MG, Ferreira WA, Klatser PR. 1998. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to Mycobacterium leprae: a field FEMS. *Immunology Medicine Microbiology.* 21(3):197-20

Bührer-Sékula-Sekula S, Cunha MG, Foss NT, Oskam L, Faber WR, Klatser PR. 2001. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. *Tropical Medicine & International Health.* 6:317-323

Bührer-Sekula S, Hamerlinck FF, Out TA, Bordewijk LG, Klatser PR 2000. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera. *Journal Immunology Methods* .21;238(1-2):55-8.

Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L 2003. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy

patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *Journal Clinical Microbioogylogy.* 41(5):1991-5.

Bührer-Sékula-Sekula S, Visschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L. 2007. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Leprosy Review*. 78:70-79.

Chanteau S, Cartel JL, Boutin JP, Roux J 1991. Evaluation of gelatin particle agglutination assay for the detection of anti-PGLI antibodies. Comparison with ELISA method and applicability on a large scale study using blood collected on filter paper. *Leprsy Review.* 62(3):255-61

Chanteau S, Cartel JL, Roux J, Plichart R, Bach MA 1988.Comparison of synthetic antigens for detecting antibodies to phenolic glycolipid I in patients with leprosy and their household contacts. *Journal Infectious Diseases.*157(4):770-6.

Chatterjee D, Cho SN, Brennan PJ, Aspinall GO1986. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin--the leprosy-specific, natural disaccharide-octyl-neoglycoprotein. *Carbohydr Residance.* 15;156:39-56.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT Jr, Balagon MV, Abalos RM, Tan EV, Walsh GP, Kim JD, Brennan PJ 2001. Detection of phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clinical Diagnostic Lab Immunology.* 8(1):138-42.

Cho SN, Fujiwara T, Hunter SW, Rea TH, Gelber RH, Brennan PJ. 1984. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. *Journal Infectious Diseases*, 150:311-322.

Cho SN, Kim SH, Cellona RV, Chan GP, Fajardo TT, Walsh GP, Kim JD 1992. Prevalence of IgM antibodies to phenolic glycolipid I among household contacts and controls in Korea and the Philippines. *Leprosy Review.* 63(1):12-20

Cho SN, Shin JS, Choi IH, Kim SH, Kim DI, Kim JD 1988. Detection of phenolic glycolipid I of Mycobacterium leprae and antibodies to the antigen in sera from leprosy patients and their contacts. *Yonsei Medicine Journal.* 29(3):219-24

Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. 1983. Serological specificity of phenolic glycolipid I from Mycobacterium leprae and use in serodiagnosis of leprosy. *Infectious Immunology*. 41(3):1077-83.

Cree IA, Srinivasan T, Krishnan SA, Gardiner CA, Mehta J, Fisher CA, Beck JS 1988. Reproducibility of histology in leprosy lesions. . *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Diseases* 56(2):296-301.

Demangel C, Britton WJ 2000. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunology Cellular Biology.* 78(4):318-24.

Douglas JT, Worth RM. 1984. Field evaluation of an ELISA to detect antibody in leprosy patients and their contacts. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases.* 52:26-33

Findlay G H. 1951. Indeterminate leprosy: a new clinical variety. *Brintain Journal of Dermatolology.* 63:100-104

Fine PE. 2006. Global leprosy statistics: a cause for pride, or frustration? *Leprosy Review* 77:295-297.

Fujiwara T, Aspinall GO, Hunter SW, Brennan PJ 1987. Chemical synthesis of the trisaccharide unit of the species-specific phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae. *Carbohydr Residance*. 1;163(1):41-52.

Fujiwara T, Hunter SW, Cho SN, Aspinall GO, Brennan PJ. 1984. 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. *Infection and Immunity*. 43:245-252.

Gelber RH, Li F, Cho SN, Byrd S, Rajagopalan K, Brennan PJ. 1989. Serum antibodies to defined carbohydrate antigens during the course of treated leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases.* 57:744-751

Godal T, Myrvang B, Samuel DR, Ross WF, Lofgren M 1973. Mechanism of "reactions" in borderline tuberculoid (BT) leprosy. *A preliminary report. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 236:45-53.

Gomez Orbaneja J, Garcia Perez A. 1950 Erythema nodosum in leprosy. *Actas Dermosifiliografics*. 42:258-272.

Goulart IM, Penna GO, Cunha G 2002. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to Mycobacterium leprae] *Review Society Brasilian Medicine Tropical*. 35(4):365-75.

Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R 2004. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Diseases*. 72(1):35-44.

Hashimoto, K., Y. Maeda, H. Kimura, K. Suzuki, A. Masuda, M. Matsuoka, M. Makino. 2002. *Mycobacterium leprae* infection in monocytederived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infection and Immunity* 70:5167–5176.

Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ 1982. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of Mycobacterium leprae. *Journal of Biological Chemistry* 257:15072-15078.

Jopling W H 1959. Indeterminate leprosy. *Proceedings of the Royal Society of Medicine.* 52:370-371.

Jopling W H 1970. Reactions in leprosy. *Leprosy Review* 41:62-63.

Jopling W H; Ridley D S,. 1962. A classification of leprosy for research purposes. Leprosy Review 33:119-128.Jopling, W.H. 1971. *Leprosy. Practitioner* 207:164-172.

Jopling,W.H ;Ridley, D.S 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-groupsystem. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 34:255-273.

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

Kumar, B., S. Dogra, and I. Kaur. 2004. Epidemiological characteristics of leprosy reactions: 15 years experience from north India. International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases 72:125–133. *Leprosy Review.* 28(4):157.

Levis WR, Gruber T, Cabrera A, Poiesz BJ 1994. Prevalence of human T cell lymphotropic virus (HTLV) types I and II and human immunodeficiency virus type 1 infections among persons with Hansen's disease in New York City. *Journal Infectious Diseases*. 170(4):1007-9.

Lowy L, Ridley DS 1954. The acid-fast staining properties of Mycobacterium leprae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 48:406-410.

Martin FI, Maddocks I, Brown JB, Hudson B 1969. Leprous endocrinopathy. *Lancet.* 21; 2(7582):1320-1.

Ministério da Saúde 2005. IV carta de eliminação da hanseníase

Ministério da Saúde 2006. Avaliação das duplicidades dos casos de hanseníase diagnosticados e notificados no sistema nacional de informação de agravos de notificação - Ministério da Saúde. 1960. Manual de leprologia.

Ministério da Saúde 2007. Boletim Sobre a Situação da Hanseníase no Brasil.

Modlin RL, Bakke AC, Vaccaro SA, Horwitz DA, Taylor CR, Rea TH. 1985. Tissue and blood T-lymphocyte subpopulations in erythema nodosum leprosum. *Archive of Dermatology* 121:216-219.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, Sampaio EP 1999. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand Journal Immunology*. 50(5):541-9.

OMS/WHO 1991-A. *Elimination of leprosy: resolution of the 44th World Health Assembly.*

OMS/WHO 1991 -B. Multi drug terapy for leprosy
http://www.who.int/lep/mdt/MDT_Regimens.pdf

OMS/WHO 2000. Guide to Eliminate Leprosy as a PublicHealth Problem http://www.who.int/lep/resources/Guide_Int_E.pdf

OMS/WHO 2001 MDT and drug resistance
http://www.who.int/lep/mdt/resistance/en/index.html

OMS/WHO 2007. Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities (Plan Period 2005–2010). www.who.int/entity/lep/resources/GlobalStrategy.pdf.

Oskam L, Slim E, Bührer-Sékula S 2003. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Leprosy Review.* 74(3):196-205.

Ottenhoff THM, Kumatratne D, Casa-Nova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type I cytokines in immunity to intracellular bacteria. 1998. *Immunology Today* 19:491–494.

PAHO 2005 Eliminação da hanseníase das Américas – disponível no site - www.opas.org.br/prevencao/site/UploadArq/b_por_02.pdf

PAHO 2007. Situação Atual Da Hanseníase No Estado Goiás, BRASIL, 2001 A 2006. http://www.paho.org/portuguese/ad/dpc/cd/painel-GO.pdf

Parkash O. 2004 A strategy to improve the ml flow test for detection of anti-phenolic glycolipid-1 antibodies. *Leprosy Review.* 75(2):192-3.

Pedley . 1973. The nasal mucus in leprosy. *Leprosy Review* 44 :33-5

Pfaltzgraff RE 1986. Tenosinovitis in leprosy. *Indian Journal Leprosy.* 58(1):163-4.

Pieters T, Rodenstein DO 2001. Therapeutic options in obstructive sleep apnoea: have we made enough progress? leep *Medicine Review.* 5(1):3-6.

Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, Lockwood DN. 2006. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad. *American Journal of Medicine and Hygiene* 74:868-879

Prigozy, T. I., P. A. Sieling, D. Clemens, P. L. Stewart, S. M. Behar, S. A. Porcelli, M. B. Brenner, R. L. Modlin, and M. Kronenberg. 1997. The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules. *Immunity.* 6:187–197.

Rees RJ. 1976. Airborne infection with Mycobacterium leprae in mice. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 44:99-103.

Ridley D S. 1955. The bacteriological interpretation of skin smears and biopsies in leprosy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 49:449-452.

Ridley D S. 1960. A bacteriologic study of erythema nodosum leprosum. *Internatinal Journal of Leprosy* 28:254-266.

Ridley DS, Jopling WH 1966. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases.* 34(3):255-73.

Rijk AJ, Gabre S, Byass P, Berhanu T 1994. Field evaluation of WHO-MDT of fixed duration, at ALERT, Ethiopia: the AMFES project--II. Reaction and neuritis during and after MDT in PB and MB leprosy patients. *Leprosy Review*. 65(4):320-32

Roche P, Dockrell H, Brennan P 1998. Progress in research towards a world without leprosy. Report of a WHO meeting in Ethiopia, February 1998. *Leprosy Review.* 69(2):151-9.

Roche PW, Britton WJ, Failbus SS, Theuvenet WJ, Lavender M, Adiga RB 1991. Serological responses in primary neuritic leprosy. *Transfetious Royal Society Tropical Medicine Hygiene*. 85(2):299-302.

Saad MH, Medeiros MA, Gallo ME, Gontijo-Filho PP, Fonseca LS 1991. The dot-ELISA test for the detection of anti-PGL-1 IgM in leprosy patients and their contacts. *Brazilian Jouranl Medicine Biology Residance* 24(5):441-8.

Sampaio S, Rivitti E, 1998. Hanseníase. In: Dermatologia, *1a edição, Artes Médicas*, 2000.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JÁ 1991. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clinical Exp Immunology*. 84(1):103 8.

Schluger NW 2001. Recent advances in our understanding of human host responses to tuberculosis. *Respir Residance* 2(3):157-63.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. 2006. The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* 19:338-381.

Sehgal VN, Rege VL, Reys M. 1977. Correlation between clinical and histopathologic classification in leprosy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 45:278-680.

Shepard C 1960. Acid-fast bacilli in nasal excretions in leprosy, and results of inoculation of mice. *American Journal of Medicine and Hygiene* 71:147-157

Shepard C. 1965. Temperature optimum of Mycobacterium leprae in mice. *Journal of Bacteriology* 90:1271-1275.

Sieling PA, Modlin RL. 1994. Regulation of cytokine patterns in leprosy. *Ann New York Academy Sciety.* 15;730:42-52.

Souza MR 2002. Presença de anticorpos anti-PGL-I em pacientes portadores de hanseníase e seus contactantes intradomiciliares. *UFG, Goiânia*.

Stefani MMA, Martelli CMT, Gillis TP, Krahenduhl JL 2003. Insitu type 1 cytokine gene expression mechanisms associated with early leprosy progression. *Journal Infections Deceases.* 168:1024-1031.

Stefani MMA, Martelli CMT, Morais-Neto OL, Martelli P, Costa MB, Andrade ALSS. 1998. Assessment of anti-PGL-1 as a prognostic marker of leprosy reaction. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Diseases* 66: 357-364.

Talhari S 1996. Bangkok Workshop on Leprosy Research. Diagnosis, classification and prognosis. . *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterium Diseases.* 64(4 Suppl):S13-4.

Van Brakel WH, Khawas IB, Lucas SB. 1994. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. *Leprosy Review* 65:190-203.

Visschedijk J, van de Broek J, Eggens H, Lever P, van Beers S, Klatser P. 2000. Mycobacterium leprae--millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. *Tropical Medicine & International Health* 5:388-399

Wade H W. 1955. Nerve abscesses and pure neuritic lesions in leprosy. *International Journal of Leprosy* 23:69-71.

Wemambu, S.N., Turk J.L., Waters M.F., and Rees R.J.. 1969. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. *Lancet* 933–935.

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 11;254:277-279

Yamamura M 1992. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 3;255(5040):12.

Young DB, Buchanan TM. 1983. A serological test for leprosy with a glycolipid specific for Mycobacterium leprae. *Science* 221:1057-1059.

Young DB, Khanolkar SR, Barg LL, Buchanan TM 1984. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of Mycobacterium leprae. *Infectious Immunology.* 43(1):183-8

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo