

# Comportamento dos testes sorológicos ML Flow e ELISA (PGL-I) em áreas endêmica e não endêmica de hanseníase

## The result patterns of ML Flow and ELISA (PGL-I) serologic tests in leprosy-endemic and non-endemic areas

Rozana Castorina da Silva<sup>1,2</sup>, Sandra Lyon<sup>1,2</sup>, Rafael Araos<sup>3</sup>, Ana Cláudia Lyon<sup>1,2</sup>, Maria Aparecida de Faria Grossi<sup>2,4</sup>, Sílvia Helena Lyon<sup>1</sup>, Rachel Adriana Penido<sup>1</sup>, Samira Bühner-Sékula<sup>5</sup> e Carlos Maurício de Figueiredo Antunes<sup>2</sup>

### RESUMO

O ML Flow e o ELISA PGL-I são testes sorológicos que detectam anticorpos IgM contra o glicolípido fenólico I específico do *Mycobacterium leprae*. Para avaliar o comportamento destes testes em áreas endêmica e não endêmica para hanseníase foram estudados 351 voluntários no Brasil e no Chile, incluindo pacientes com hanseníase, controles sadios, portadores de outras doenças infecciosas, não infecciosas e dermatoses que fazem diagnóstico diferencial com hanseníase. O ponto de corte do ELISA foi estabelecido pelo método da Curva ROC ( $\geq 0,157$ ). Em área endêmica, o ML Flow apresentou resultados positivos em 70% dos pacientes com hanseníase; o ELISA foi positivo em 53,3%. Em área não endêmica, o ML Flow foi negativo em todos os voluntários testados; o ELISA foi positivo em 4 voluntários. O ML Flow é um ensaio mais rápido, facilmente aplicável e, portanto, mais adequado para ser utilizado na Atenção Básica; o ELISA necessita, além de uma infra-estrutura de laboratório adequada, pessoal treinado e especializado em sua execução.

**Palavras-chaves:** Testes sorológicos. Antígeno PGL-I. Hanseníase. ML Flow. ELISA.

### ABSTRACT

ML Flow and anti-PGL-I ELISA are serological tests that detect IgM antibodies against the phenolic glycolipid I (PGL-I), specific to *Mycobacterium leprae*. To evaluate the outcomes of ML Flow and ELISA (PGL-I) serological tests in leprosy-endemic areas in comparison to non-endemic ones, a total of 351 volunteers from Brazil and Chile were examined, including leprosy patients, healthy controls and others affected by other infectious or non-infectious diseases that are common differential diagnoses for leprosy. The ELISA cut-off point was established using the ROC Curve method ( $\geq 0.157$ ). In endemic areas, 70% of leprosy patients present positive ML Flow results and 53.3% were ELISA-positive. In non-endemic areas, ML Flow was negative in all the subjects tested and ELISA was positive in 4 volunteers. ML Flow is faster and more easily performed and, therefore, a more adequate test for use in basic, primary-level health care centers. ELISA requires trained personnel, in addition to a more complex laboratory infrastructure.

**Key-words:** Serologic tests. PGL-I antigen. Leprosy. ML Flow. ELISA.

A hanseníase, ainda hoje, é uma doença endêmica em alguns países, incluindo o Brasil. A doença já foi prevalente em praticamente todo o mundo, inclusive na Europa e América do Norte, em alguma época da evolução da humanidade. Atualmente, é encontrada nas regiões tropicais e subtropicais e está relacionada com a pobreza<sup>3</sup>.

Em 1953, o Brasil possuía 62.010 casos conhecidos de hanseníase, para uma população de 55.211.268 milhões de habitantes<sup>14</sup> no Chile Continental não havia nenhum caso registrado. Em 1982, não havia nenhum registro de hanseníase no Chile Continental<sup>7</sup> em 1999, foram registrados três casos

de hanseníase em indivíduos procedentes da Polinésia<sup>1</sup> e que mantinham vínculo trabalhista no Peru. Provavelmente, devido a alguns fatores como clima, topografia, imunidade conferida pelos programas de vacinação BCG e, ainda, a teoria de que o DNA dos chilenos os protege, o Chile Continental é considerado como área indene de hanseníase<sup>7</sup>.

No continente americano, em 2006, de acordo com dados da OMS, o Brasil era o único país considerado endêmico, possuindo a maioria dos casos novos diagnosticados no ano (44.436). O Chile não registrou nenhum caso novo naquele ano. Em 2006, a prevalência no Brasil era de 60.567 casos<sup>17</sup>.

Presumindo-se que a prevalência de soropositividade na população reflita taxa de exposição e ou infecção<sup>2,8</sup>, os testes sorológicos podem ser de grande valia na determinação da magnitude da hanseníase em uma comunidade, bem como um indicador de medida de controle através de levantamentos sorológicos repetidos<sup>10,15</sup>. Poderia ser possível monitorizar alteração na intensidade de exposição ao *Mycobacterium leprae* e determinar tendências epidemiológicas, como extensão da transmissão em uma comunidade<sup>15</sup>. Bach *cols* demonstraram que a sorologia poderia ser método útil no seguimento clínico dos pacientes de hanseníase, pois os níveis de anticorpos diminuem durante a administração do tratamento específico<sup>1</sup>.

1. Serviço de Dermatologia Sanitária, Hospital Eduardo de Menezes, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 2. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 3. Serviço de Medicina Interna, Hospital Del Salvador, Universidad de Chile, em Santiago de Chile, Chile. 4. Coordenação Estadual de Dermatologia Sanitária, Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 5. KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands. Filiação atual: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

**Endereço para correspondência:** Dra. Rozana Castorina da Silva, Avenida do Contorno, 4852, sala 601, Bairro Funcionários, 30110-032 Belo Horizonte, MG, Brasil.

Telefax: 55 31 31 3227-0092

e-mail: rozanacastorina@globo.com; cemepe@cemepemg.com.br

Desde o início do século passado, diversos métodos têm sido desenvolvidos para estudo dos anticorpos específicos para o *Mycobacterium leprae* e, atualmente, existem diversos antígenos micobacterianos disponíveis para investigação desses anticorpos em portadores de hanseníase<sup>12</sup>; o mais utilizado é o ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay<sup>6 13</sup> para detectar a presença de anticorpos contra o glicolípido fenólico específico do *Mycobacterium leprae* (PGL-I), sobretudo IgM. Com essa mesma finalidade, em 2003, foi desenvolvido um teste simples e rápido, o ML Flow<sup>5</sup>, que mostrou ser um teste de mais fácil execução, dispensando laboratório, sendo possível sua utilização como ferramenta auxiliar para classificação dos pacientes para fins de tratamento nas Unidades Básicas de Saúde.

Este estudo teve como objetivo avaliar o comportamento dos testes sorológicos ML Flow e ELISA (PGL-I) em área endêmica e não endêmica de hanseníase, uma vez que estudos anteriores, embora tenham sido realizados em área não endêmica, poderiam existir imigrantes de países endêmicos, que desenvolveriam anticorpos contra *Mycobacterium leprae*, o que não ocorreu no Chile.

**MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido no Brasil e no Chile, países considerados, respectivamente, como áreas endêmica e não endêmica de hanseníase. No Brasil, foi realizado no ambulatório de Dermatologia do Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais; no Chile, no *Servicio de Medicina Interna del Hospital del Salvador (Universidad de Chile, sede Oriente)*, em Santiago.

A amostra da área endêmica de hanseníase foi constituída de 60 casos de hanseníase, 28 portadores de hepatite, 29 portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, 27 portadores de tuberculose, 10 portadores de doenças tropicais (pênfigo foliáceo, paracoccidiodomicose) e, seis pacientes portadores de psoríase. Os controles sadios (72 indivíduos sem sintomas clínicos de doenças) doadores de sangue e voluntários da população geral.

A amostra estudada em área não endêmica foi constituída de 27 pacientes com o diagnóstico de tuberculose, 33 portadores de síndrome de imunodeficiência adquirida, 28 portadores de doenças inflamatórias auto-imunes (artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriásica) e 30 profissionais do Serviço, sem sintomas clínicos de doença (controles).

Os testes ML Flow e ELISA foram realizados segundo técnicas descritas<sup>5</sup>. O ML Flow foi registrado de modo qualitativo (positivo ou negativo) e semi-quantitativo (zero, 1+, 2+, 3+ e 4+); o ponto de corte do ELISA foi estabelecido pelo método da *Curva ROC* (Receiver Operating Characteristic); resultados positivos foram considerados quando a densidade ótica em 450/630nm foi igual ou superior que 0,157. Em ambas as técnicas, foi utilizado o antígeno semi-sintético, trissacarídeo natural ligado à albumina de soro bovino NT-P-BSA. A análise estatística foi realizada utilizando-se a técnica de curva ROC, análise univariada e estudo da concordância.

Este estudo teve a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais por meio de parecer nº 393/07. Os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**RESULTADOS**

Os resultados obtidos com o teste ML Flow em área não endêmica foram todos negativos; em área endêmica, o teste foi positivo em 70% (42/60) dos pacientes com hanseníase, em 6,9% (5/72) dos participantes controles, em 7,1% (2/28) dos pacientes com hepatites, em 3,4% (1/29) dos pacientes HIV positivos, em 11,1% (3/27) dos pacientes com tuberculose, em 20% (2/10) dos pacientes com o diagnóstico de doenças tropicais e em 33,3% (2/6) dos pacientes com psoríase (**Tabela 1**). Ressalte-se que os dois últimos grupos eram constituídos de 10 e 6 participantes, respectivamente.

O teste ELISA (PGL-I) em área não endêmica foi positivo em 3,4% (4/118) dos participantes. Em área endêmica, resultados

**TABELA 1**

Distribuição por freqüência do resultado semi-quantitativo do teste ML Flow nas áreas endêmica e não endêmica de hanseníase, 2006.

Grupos	ML Flow										Total nº
	0		1+		2+		3+		4+		
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	
Hanseníase	18	30,0	12	20,0	6	10,0	7	11,7	17	28,3	60
Controle	67	93,1	5	6,9	0	-	0	-	0	-	72
Hepatite	26	92,9	1	3,6	1	3,6	0	-	0	-	28
Brazil	28	96,6	1	3,4	0	-	0	-	0	-	29
Tuberculose	24	88,9	1	3,7	2	7,4	0	-	0	-	27
Doenças Tropicais	8	80,0	2	20,0	0	-	0	-	0	-	10
Psoríase	4	66,7	1	16,7	1	16,7	0	-	0	-	6
Chile	30	100,0	0	-	0	-	0	-	0	-	30
Tuberculose	27	100,0	0	-	0	-	0	-	0	-	27
AIDS	33	100,0	0	-	0	-	0	-	0	-	33
Doenças inflamatórias	28	100,0	0	-	0	-	0	-	0	-	28

positivos foram observados nos grupos de pacientes com o diagnóstico de hanseníase (53,3%), tuberculose 10,7% e no grupo controle 6,9% (**Tabela 2**).

O índice de concordância (kappa) entre o ML Flow e o ELISA (PGL-I) foi 0,628 (substancial, **Tabela 3**).

**TABELA 2**

Distribuição por frequência do resultado do teste sorológico ELISA (PGL-I) nas áreas endêmica e não endêmica de hanseníase, 2006.

Grupo	Número	Frequência de soropositividade ponto de corte 0,157	
		n <sup>a</sup>	%
<b>Região endêmica</b>			
controle	72	5	6,9
hanseníase	60	32	53,3
hepatite	28	0	
AIDS	29	0	
tuberculose	28	3	10,7
doenças tropicais	10	0	
psoríase	6	0	
subtotal	233	40	17,2
<b>Região não endêmica</b>			
controle	30	1	3,3
AIDS	33	1	3,0
tuberculose	27	1	3,7
doenças inflamatórias	28	1	3,6
Subtotal	118	4	3,4

**TABELA 3**

Concordância entre os resultados dos testes sorológicos ML Flow e Elisa anti-PGL-I ( $cut-off \geq 0,157$ ) em todos os grupos estudados, 2006.

		ML Flow		Total
		negativo	positivo	
ELISA (PGL-I $\geq 0,157$ )	negativo	285	23	308
	positivo	9	34	43
	Total	294	57	351

Índice de kappa = 0,628 IC95% (0,510 ; 0,746), p-valor = 0,000

## DISCUSSÃO

Observou-se soronegatividade do ML Flow em todos os participantes de área não endêmica; estes resultados mostram que populações de área sem hanseníase não desenvolvem anticorpos contra o antígeno PGL-I, específico do *Mycobacterium leprae*.

O percentual de soropositividade do ML Flow em indivíduos sadios de área endêmica de hanseníase foi de 6,9%, esta proporção foi menor que a relatada em estudo anterior que mostrou percentual de 12%, o que sugere um possível contato prévio com o *Mycobacterium leprae*, porém não houve manifestação da doença<sup>5</sup>.

A soropositividade do ML Flow em portadores de hanseníase foi de 70%, enquanto que, em outros estudos, foram encontrados

72,9%<sup>5</sup>; 50,7%<sup>9</sup>; 57%<sup>11</sup>, o que poderia ser explicado pelo fato de que todos os pacientes no presente estudo foram identificados em Centro de Referência, para onde são encaminhados, em geral, casos mais complexos, predominantemente multibacilares.

A proporção da soropositividade do teste ELISA (PGL-I) em área não endêmica foi baixa; a maioria dos participantes com teste positivo apresentou títulos (densidade ótica) próximos ao ponto de corte; resultados compatíveis com estudos prévios<sup>4,5</sup>.

Foi constatado que a positividade do teste ML Flow e do ELISA em indivíduos sem hanseníase varia de acordo com o nível de endemicidade da hanseníase da área geográfica em que o teste foi utilizado, pois em área não endêmica observou-se a soronegatividade do ML Flow em todos os participantes e somente 4 dos participantes tiveram ELISA positivo, independente do diagnóstico da patologia dos mesmos. Modelos etiológicos atuais indicam que, em doenças infecciosas, o agente é necessário, mas não suficiente para a manifestação da doença<sup>16</sup>.

## CONCLUSÃO

Os testes ML Flow e ELISA têm comportamento semelhante na detecção de anticorpos anti-PGL-I e a possível expressão do antígeno PGL-I em outros microorganismos não compromete o desempenho destes testes na alocação dos pacientes com hanseníase para o tratamento adequado. A positividade do teste sorológico ML Flow em indivíduos sem hanseníase varia significativamente de acordo com o nível de endemicidade da doença na área geográfica em que o teste é utilizado

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil) e KIT Biomedical Research Department (Amsterdam, the Netherlands) pelo suporte técnico e o Netherlands Leprosy Relief (Amsterdam, Netherlands) pelo suporte financeiro. Ao Sr. Vinícius de Souza Góes pelo apoio técnico na BTI-Bio Tecnologia Industrial Ltda. O NT-P-BSA usado na produção do teste sorológico ML Flow foi gentilmente fornecido por Dr. Fujiwara, Institute for Natural Science, Nara University, Nara, Japan.

## REFERÊNCIAS

- Bach MA, Wallach D, Flageul B, Cottenot F. Antibodies to phenolic glycolipid-I and to whole *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: evolution during therapy. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases* 54: 256-267, 1986.
- Beers SM, Madeleine YL, Klatsner PR. The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: Recent insight. *Fems Microbiology* 136: 221-230, 1996.
- Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *The Lancet*, 363: 1209-1219, 2005.
- Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC. A simple dipstick assay for the antibodies to phenolic glycolipid-i *Mycobacterium leprae*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 133-136, 1998.
- Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatsner PR, Oskam L. Simple and fast lateral Flow Test for classification of leprosy

- patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1991-1995, 2003.
6. Cho SN, Yanagibara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity* 41: 1077-1083, 1983.
  7. Fine PEM. Leprosy: The epidemiology of a slow bacterium. *Epidemiologic Reviews* 4: 161-188, 1982.
  8. Gonzalez-Abreu E, Mora N, Perez M. Serodiagnosis of leprosy in patients contacts by enzyme-linked immunosorbent assay. *Leprosy Review* 61: 145-150, 1990.
  9. Grossi MAF. Estudo das possíveis mudanças na classificação da hanseníase com utilização do teste ML FLOW e suas implicações no tratamento e controle da endemia em Minas Gerais. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
  10. Klatser PR, Cho SN, Brennan PJ. The contribution of serological tests to leprosy control. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases* 64:(Supl II) 563-566, 1996.
  11. Lyon S. Estudo comparativo da carga bacilar em casos novos de hanseníase e o resultado do teste Sorológico ML Flow Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
  12. Menzel S, Harboe M, Bergsvik H, Brennan PJ. Antibodies to a Synthetic Analog of Phenolic Glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* in Healthy Household Contacts of Patients with Leprosy. *International Journal of Leprosy* 55: 617-625, 1987.
  13. Miller RA, Gorder D, Harnisch JP. Antibodies to phenolic glycolipid I during long-term therapy: serial measurements in individual patients. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases* 55: 633-636, 1987.
  14. Organización Mundial de la Salud. XIV Conferência Sanitária Panamericana. Memória. In Bica NA, Roman J, Saenz AC (eds) El problema de la lepra en las Americas. Servicio de Enfermedades Transmisibles., Oficina Sanitária Panamericana. Oficina regional de la Organización Mundial de la Salud. Washington, DC. p. 548, 1957.
  15. Qinxue W, Xinyu L, Yueping Y, Qi L, Lilin Z. A Study on the methods for early serological diagnosis of leprosy and potencial use. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 67: 302-305, 1999.
  16. Soebono H, Klatser PRA. Seroepidemiological Study of Leprosy in High – and Low-endemic Indonesian Villages. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 59: 416-425, 1991.
  17. World Health Organization. Weekly epidemiological record 225.; Global leprosy situation, 2007 n: 25, 82 225-232. Disponível em < [www.who.int/wer](http://www.who.int/wer)> Acesso em setembro/2007.