



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

MARIA HELIANA CHAVES MONTEIRO DA CUNHA

**PERFIL DE ANTICORPOS ANTI-PGL-1 EM INDIVÍDUOS SADIOS DE ÁREAS
ENDÊMICAS EM HANSENÍASE DO ESTADO DO PARÁ, MÉTODO DE ELISA.**

BELÉM (PA)

2012

MARIA HELIANA CHAVES MONTEIRO DA CUNHA

**PERFIL DE ANTICORPOS ANTI-PGL-1 EM INDIVÍDUOS SADIOS DE ÁREAS
ENDÊMICAS EM HANSENÍASE DO ESTADO DO PARÁ, MÉTODO DE ELISA.**

Tese de Doutorado, apresentada à banca de examinadores do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de doutor em Doenças Tropicais.

Orientador: Profa. Dra. Marília Brasil Xavier

BELÉM (PA)

2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Cunha, Maria Heliana Chaves Monteiro da.

Parâmetro de referência para soropositividade do teste Anti-PGL-1 na Hanseníase em áreas endêmicas do Estado do Pará / Maria Heliana Chaves Monteiro da Cunha; orientadora, Marília Brasil Xavier. – 2012

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Hanseníase. 2. Testes sorológicos. 3. ELISA. 4. Ponto de corte. 5. Epidemiologia. 6. Pará. I. Xavier, Marília Brasil, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.998098115

MARIA HELIANA CHAVES MONTEIRO DA CUNHA

**PERFIL DE ANTICORPOS ANTI-PGL-1 EM INDIVÍDUOS SADIOS DE ÁREAS
ENDÊMICAS EM HANSENÍASE DO ESTADO DO PARÁ, MÉTODO DE ELISA.**

Tese de Doutorado apresentada para obtenção do título de doutor em Doenças Tropicais

Banca Examinadora

Profa. Dra. MARÍLIA BRASIL XAVIER
Orientadora - NMT/UFPA

Prof. Dr. MARCELO TÁVORA MIRA
Avaliador - PUCPR

Prof. Dr. JUAREZ ANTÔNIO SIMÕES QUARESMA
Avaliador - NMT/UFPA

Profa. Dra. LUIZA MARTINS CARÍCIO
Avaliador - NMT/UFPA

Profa. Dra. SÍLVIA FERREIRA MÜLLER
Avaliador - UFPA

Profa. Dra. CARLA VALÉRIA BATISTA LIMA
Avaliador Suplente / UEPA/IEC

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	HANSENÍASE / CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	16
3.2	CARACTERÍSTICAS DO <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i>	18
3.3	EPIDEMIOLOGIA	20
3.1	Situação epidemiológica da hanseníase na Amazônia	22
3.4	IMUNOLOGIA DA HANSENÍASE	27
3.4.1	Resposta imunológica a patógenos intracelulares	27
3.4.2	Resposta imunológica na hanseníase	29
3.5	SOROLOGIA ANTI-PGL-1: CONTRIBUIÇÕES NO CONTROLE DA HANSENÍASE.....	33
3.6	SOROPOSITIVIDADE DO TESTE ANTI-PGL-1 PELO MÉTODO ELISA: PONTO DE CORTE	40
4	METODOLOGIA	44
4.1	TIPO DE ESTUDO	44
4.2	POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO	44
4.2.1	Critérios de inclusão e exclusão	45
4.3	CARACTERÍSTICAS DA ÁREA DE ESTUDO.....	46
4.4	INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS.....	49
4.5	PROCEDIMENTOS DE CAMPO.....	50
4.5.1	Seleção dos doadores	50
4.5.2	Procedimentos da coleta de sangue	51
4.5.3	Procedimentos laboratoriais para a sorologia ELISA	51
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4.7	NORMAS ÉTICAS.....	54
4.8	AVALIAÇÃO DE RISCO / BENEFÍCIO	54
5	RESULTADOS	55
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	80
	APÊNDICES	95
	ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença crônica infecciosa de notificação compulsória; integra o grupo das doenças estigmatizantes e negligenciadas. Tem como uma das principais características, o polimorfismo, tanto do ponto de vista clínico como laboratorial. Seu agente etiológico, *Mycobacterium leprae*, continua despertando o interesse dos pesquisadores em relação aos seus aspectos estruturais e sua relação com a resposta imunológica do hospedeiro.

O diagnóstico da hanseníase com base nos sinais cardinais clínicos de lesões cutâneas, como alterações de sensibilidade e espessamento dos nervos periféricos, é uma norma do Ministério da Saúde, o qual simplificou bastante a classificação da doença visando facilitar o diagnóstico e tratamento no campo da saúde pública e consequente aumento da extensão de cobertura e controle da doença (YAWALKAR, 2002). No entanto, em virtude da complexidade da doença, algumas dificuldades no diagnóstico clínico existem; uma delas é a avaliação de alguns casos mais complexos que apresentam sinais clínicos menos expressivos. Outra, diz respeito à identificação de infecções subclínicas que são prováveis responsáveis pela manutenção da cadeia de infecção ao longo do tempo e carecem de recursos que auxiliem na descoberta (SAUNDERSON; GROENEN, 2000; BARROS; OLIVEIRA, 2000; BRITO; XIMENES; GALLO, 2008).

Os critérios convencionais para confirmação laboratorial do diagnóstico clínico de hanseníase são constituídos pelos exames baciloscópico e histopatológico, os quais são úteis, porém, muitas vezes, chegam a não ser característicos gerando dúvidas, além do que, essas técnicas são invasivas compostas de várias etapas e podem apresentar limitações operacionais, possibilitando a existência de erros (OLIVEIRA; CAVALIÉRE; MACIEIRA; BÜHRER-SÉKULA, 2008).

Após a identificação que o anticorpo IgM é um marcador imunobiológico contra o antígeno específico do *M. leprae*, PGL-1, surgiu nova possibilidade de identificar infecção sub-clínica em indivíduos expostos ao *M. leprae*, sem sinais clínicos da doença, através da sorologia pelo método ELISA, assim como auxiliar em outras necessidades de complementação clínica (BRETT, et al., 1984 ; BARROS; OLIVEIRA, 2000; BRITO; XIMENES; GALLO, 2008).

No Brasil, onde a hanseníase ainda persiste com elevados coeficientes de detecção, inclusive em menores de quinze anos, em especial nas Regiões Norte e Centro-Oeste (ILA, 2002; BRASIL, 2010), os profissionais de saúde que lidam com esses pacientes ainda encontram dificuldade na avaliação de alguns casos mais complexos que apresentam sinais clínicos menos expressivos da doença, necessitando muitas das vezes do apoio laboratorial, inclusive da sorologia (ILA, 2002; BRITO; XIMENES; GALLO, 2008.).

Os resultados de estudos soroepidemiológicos, para hanseníase, utilizando testes sorológicos como o anti-PGL-1 pelo método Elisa, realizados no Estado do Pará, onde os municípios, em sua maioria, alcançam patamares de elevada endemicidade, podem ser comprometidos pela ausência de definição local de parâmetros dos níveis de anticorpos específicos anti-PGL-1; assim como, as avaliações e o seguimento de casos de pacientes reacionais e suspeitos de recidiva, ou de doentes e infectados sem sinais clínicos, uma vez que autores defendem a posição de que o ponto de corte, entre positivos e negativos, deve ser encontrado a partir de uma população de doadores não contato de hanseníase da própria área de estudo para possibilitar comparabilidade (MENZEL, 1987; FOSS; CALLERA; ALBERTO, 1993). Nesse sentido, considera-se pertinente o conhecimento do comportamento sorológico dos anticorpos anti-PGL-1(IgM) entre doadores de sangue de áreas endêmicas do Estado do Pará, e a partir daí determinar ponto de corte específico para essas áreas endêmicas.

A justificativa deste trabalho se apóia na necessidade de descrever o comportamento sorológico de anticorpos específico, IgM, anti-PGL-1 em doadores de sangue de áreas de elevada endemicidade do Estado do Pará, e na possibilidade da identificação de ponto de corte para o teste anti PGL-1, que expresse o status imunológico relacionado a endemicidade nessas áreas. Tal identificação poderá contribuir para melhor definição de casos de hanseníase e ações de vigilância.

O estudo parte das seguintes hipóteses: 1. Existe correlação entre o comportamento sorológico anti-PGL-1 na população sadia dos municípios estudados e os níveis de endemicidade em hanseníase 2. Existe diferença entre o ponto de corte encontrado em outros estudos e o ponto de corte que defina o status imunológico da população do Pará.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Descrever o perfil sorológico dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 de indivíduos sadios oriundos de áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará, pelo método de ELISA, e sua correlação com níveis de endemicidade locais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Conhecer os níveis sorológicos de anticorpos (IgM) anti-PGL-1 da população estudada;
- Correlacionar a média dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 com variáveis independentes como: sexo, idade e vacina BCG, para avaliar a influência dessas variáveis no perfil dos anticorpos anti-PGL-1 na população estudada;
- Averiguar taxas de soropositividade e soroprevalência anti-PGL-1 em relação às gradações de endemicidade das áreas do estudo utilizando ponto de corte 0,20, parâmetro este utilizado em outros estudos no Brasil;
- Identificar valores de ponto de corte para o teste anti-PGL-1, método ELISA, nas amostras de sangue dos doadores das áreas estudadas segundo: média geral global dos níveis de anti-PGL-1, média dos níveis de anti-PGL-1 por hemocentro e por municípios;
- Analisar o comportamento da soropositividade, com base no ponto de corte geral global, em relação aos dados demográficos (sexo e idade) e vacina BCG, relacionando-o com os níveis de endemicidade das áreas do estudo, e comparar esses resultados com os obtidos com base no PC de 0,20.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 HANSENÍASE: CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hanseníase caracteriza-se por ser uma doença infecciosa crônica, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, que pode afetar a pele, nervos periféricos, mucosa do trato respiratório, olhos e outras estruturas (JOPLING; MC DOUGALL, 1991). O homem é reconhecido como a principal fonte de infecção e o mais importante reservatório para saúde pública. A principal forma de transmissão acontece pelas vias aéreas superiores entre pessoas que tenham contato direto com um portador não tratado. É reconhecida como doença de amplo espectro clínico e imunopatológico (GROSSI, 1987; LOMBARDI, 1990; JOPLING; MC DOUGALL, 1991).

Por ser uma doença polimórfica, o diagnóstico tem por base o conhecimento e entendimento do conceito espectral da doença que possibilita a relação entre o curso clínico evolutivo e a extensão do comprometimento neural, característico de cada forma clínica. Tal peculiaridade motivou a elaboração de diversas classificações. A classificação oficial mais utilizada em campo no Brasil é a de Madri que surgiu durante o VI Congresso Internacional de Leprologia em 1953 que classificou a hanseníase com base em critérios clínicos e baciloscópicos em dois tipos **estáveis**, também denominados de pólos tuberculóide (T) e virchowiano (V) e em dois grupos considerados **instáveis**, o indeterminado (I) que é tido como a forma inicial da doença e o dimorfo (D) que é a forma intermediária (OPROMOLA, 2000; BRASIL, 2002; TALHARI et al., 2006; WHO, 2007).

A hanseníase indeterminada (HI) é considerada como o primeiro tipo a surgir e causar manifestações clínicas, tais como, formigamento que pode evoluir para anestesia; mancha hipocrômica que pode ser uma única lesão ou chegar até seis, acompanhada ou não de perda de anexos (pêlos, glândulas sudoríparas e sebáceas). O transcurso desta forma clínica está relacionado ao tipo de defesa do organismo do indivíduo, podendo evoluir para cura ou para outra forma clínica benigna, ou seja, não transmissível representada pelo pólo tuberculóide (TALHARI; NEVES, 1997; TALHARI et al., 2006; BRASIL, 2009, BRASIL, 2010).

A hanseníase tuberculóide apresenta como manifestação clínica, lesão dermatológica em forma de placas hipocrômicas ou eritematosas de bordas bem delimitadas, cujo crescimento é centrífugo, lento, observando-se em conseqüência, descamação das bordas e aspecto tricofitóide. Hanseníase virchowiana (HV) é a forma transmissível, os bacilos vão se alojar nas regiões frias como pele, olhos, testículos e troncos nervosos. As lesões são, em geral, simétricas em tronco e face, o paciente apresenta perda de pêlo, madarose e infiltrações, além de outros comprometimentos sistêmicos. A hanseníase dimorfa (HD), devido à instabilidade imunológica, oscila entre os dois pólos tuberculóide (T) e virchoviano (V), pode apresentar lesões de pele bem delimitadas e, ao mesmo tempo ter lesões infiltradas e mal delimitadas, sendo considerada multibacilar (TALHARI; NEVES, 1997; TALHARI et al., 2006; BRASIL, 2009, BRASIL, 2010).

A segunda classificação foi criada por Ridley e Jopling (1966), adota subgrupos dentro do espectro, ou seja, subdivide a hanseníase em cinco formas, leva em consideração aspectos clínicos e bacteriológicos, como também, imunológicos e histopatológicos da doença, é utilizada em estudos imunológicos para publicações científicas. Os grupos são: Tuberculóide-Tuberculóide (TT) e Lepromatoso-Lepromatoso (LL); os subgrupos: Borderline-Tuberculóide (BT), Borderline-borderline (BB), Borderline-Lepromatoso (BL) (RIDLEY; JOPLING, 1991).

Pela necessidade de expansão da campanha de eliminação da hanseníase, a OMS (1982) propôs uma terceira classificação que favorece o trabalho de campo, dando um direcionamento mais prático dentro da saúde pública criou critério exclusivamente clínico, tendo como base o número de lesões na pele e nervos espessados, a saber: paucibacilares (PB) até cinco lesões sem infiltração e multibacilares (MB) mais de cinco lesões, ou, até cinco se infiltradas. A baciloscopia, quando solicitada e positiva, classifica o caso como MB independente do número de lesões. Os pacientes com doença hanseníase do tipo neural pura serão considerados paucibacilares quando apresentarem um único tronco nervoso envolvido e multibacilares quando existirem dois ou mais troncos afetados. No Brasil, o Ministério da Saúde passou a adotar essa norma em 2000, através da portaria 1.073 de 26 de setembro de 2000 (WHO, 1982; OPROMOLA, 2000; BRASIL, 2010).

3.2 CARACTERÍSTICAS DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE*.

O *M. leprae* ou bacilo de Hansen é um patógeno intracelular obrigatório não cultivável *in vitro* até os dias atuais. Foi o primeiro microrganismo a ser identificado como agente etiológico de uma doença humana, é capaz de infectar grande número de pessoas (alta infectividade), mas, poucos adoecem (baixa patogenicidade). O período de incubação é longo, em virtude de se reproduzir de maneira binária simples, uma média de 13 a 14 dias, sendo necessários alguns anos para que possa atingir carga bacilar suficiente para expressar a doença clinicamente (HARBOE, 1985; TALHARI et al., 2006; BRASIL, 2010).

As tentativas de cultivo em meios artificiais ainda não obtiveram sucesso; experiência em camundongos (técnica de Shepard, 1960) identificou, que o *M.leprae* multiplica-se em um período de seis a oito meses, atingindo um platô e decrescendo em seguida, de acordo com o estado imunológico da cobaia (JOPLING; MC DOUGALL, 1991).

O *Micobacterium leprae* (Figura1) pertencente à classe *Corynebacterineae* e família *Mycobacteriaceae*. Apresenta-se nos tecidos humano como um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, medindo aproximadamente 1 a 8 mm de comprimento por 0,2 a 0,5 mm de diâmetro (REES et al., 1994). É um bacilo gram positivo e álcool-ácido resistente quando corado pelo método de Ziehl- Neelsen. A localização das lesões hansênicas no corpo dos pacientes (pele, mucosas e nervos periféricos) sugere que o bacilo tem preferência por temperaturas menores que 37° C, onde as células-alvo são macrófagos na pele, e as células de Schwann que formam a bainha de mielina dos nervos periféricos (DRAPER, 1986; JOPLING; MC DOUGALL, 1991; LOMBARDI, 1990).

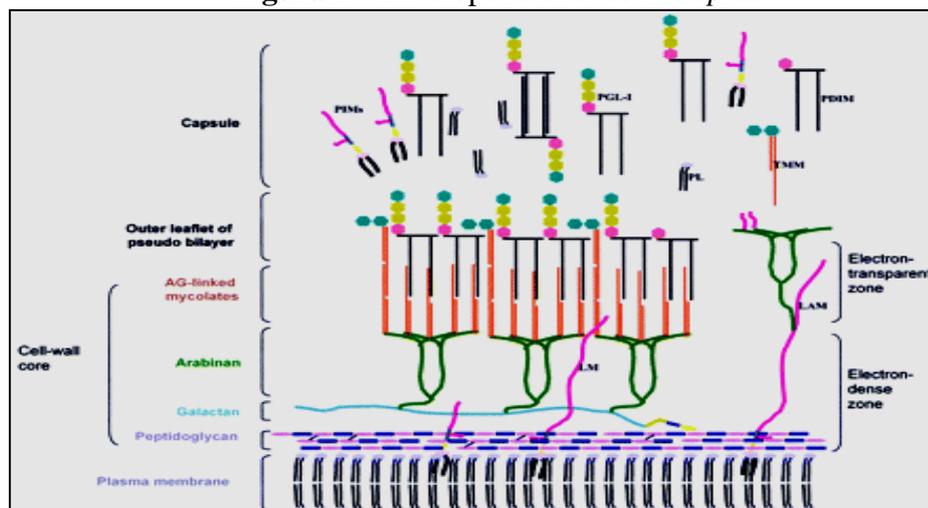
Figura 1- *M. Leprae* ou bacilo de Hansen



Fonte: Levy, B. Portifólio. Hanseníase, 2012.

Estruturalmente o envelope deste patógeno, assim como, o de outras micobactérias, está dividido em duas partes: membrana plasmática e parede celular (Figura 2). A primeira é constituída por uma bicamada fosfolipídica clássica, cuja característica principal, é a presença de glicolipídios peculiares como a lipoarabinomanana (LAM) e a lipomanana (VISSA; BRENNAN, 2001). A parede celular apresenta espessura em torno de 20nm, formada por peptídeoglicanos ligados a cadeias polissacarídeas que dão suporte aos ácidos micólicos semelhante a outras micobactérias. Contornando a parede celular existe uma estrutura denominada cápsula, rica em lipídios, principalmente os ácidos micólicos, que confere ao bacilo a propriedade álcool-ácido resistente (Método de Ziehl-Neelsen) (JOPLING; McDOUGALL, 1991). Aos lipídeos também é imputada a responsabilidade pela formação da zona elétron transparente e pelo aspecto espumoso observado no interior de macrófagos de pacientes virchovianos (BRITTON, 1983).

Figura 2 - Envelope celular do *M. leprae*



Fonte: Vissa; Brennan, 2001. p.3

Na parede celular de *M. leprae* encontra-se o glicolipídio fenólico-I (PGLI), descrito por Hunter e Brennan em 1981, que é um componente majoritário e exclusivo do envoltório externo de *M. leprae*. Está envolvido na imunogenicidade e patogenicidade na infecção por *M. leprae*, além de induzir uma grande produção de anticorpos anti-IgM em pacientes, e está relacionado a carga bacteriana do indivíduo, despertando então interesse no que diz respeito a sua utilização no diagnóstico precoce da hanseníase (HUNTER; BRENNAN, 1981).

O genoma do *M. leprae* foi sequenciado por Cole et al. (2001), com 1.600 genes caracterizados. Se comparado aos 3.959 genes do *M. tuberculosis* pode ser considerado pequeno, fato que poderia justificar, segundo os pesquisadores, o crescimento lento do bacilo de Hansen.

3.3 EPIDEMIOLOGIA

Após a implantação da polioquimioterapia (PQT/OMS, 1982), aconteceram mudanças importantes na situação epidemiológica da hanseníase a nível mundial relacionadas com a taxa de prevalência que declinou em torno de 85%; relacionadas ao número de pessoas que foram tratadas e curadas, em torno de 9.8 milhões e também ao número de países onde a hanseníase ainda é problema de saúde pública, que passou de 122 para 24 países. Todo esse avanço impulsionou uma meta proposta pela OMS, que seria reduzir a prevalência da hanseníase para menos de 1 caso em cada 10.000 habitantes até o ano de 2000 (WHO, 1999; ANDRADE, 2006).

A despeito dos esforços empregados na tentativa de alcançar a eliminação da hanseníase, como problema de saúde pública, em alguns países endêmicos como Índia, Brasil, Madagascar, Nepal, Moçambique, Guinéia, Nigéria, Myanmar e Etiópia, a meta não foi alcançada (WHO, 2007). No ano de 2008, foram detectados 249.007 novos casos em 121 países; em 2009 a prevalência na população mundial foi de 213.036 casos (WHO, 2009).

O grande número de casos de hanseníase registrados no Brasil continua posicionando-o num incômodo segundo lugar no mundo, o primeiro é a Índia (WHO, 2011). Contribuem para essa realidade, principalmente, as regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, onde foram identificados conglomerados de casos novos de hanseníase (clusters) e indícios de transmissão ativa (PENNA, 2008) (Figura 3). Diante desse cenário, a OMS propôs mudanças na meta de eliminação da hanseníase, o indicador de prevalência foi substituído pelo indicador de casos novos (BRASIL; OMS, 2008; WHO, 2011).

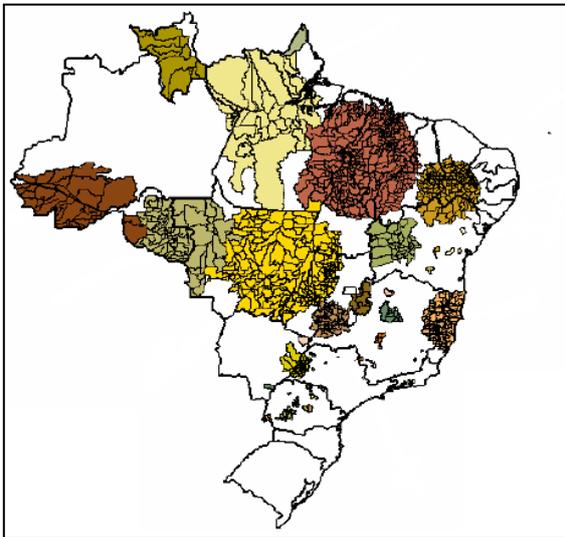
Somando-se a essa iniciativa nova estratégia surgiu em 2009, foi criada a taxa de casos novos com grau 2 de incapacidade por 100.000 habitantes para monitorar o progresso do controle da doença, visando com isso, reduzir o diagnóstico de casos com grau de

incapacidade 2 (deficiências visíveis) em todo mundo em pelo menos 35% até o final de 2015 em comparação à linha base 2010. É esperado que ocorra implementação de atividades que reduzam atrasos no diagnóstico e tratamento com a poliquimioterapia em cada país e região (WHO, 2010).

Em 2009, o Brasil detectou 37.610 casos novos, sendo 2.699 (7.1%) em menores de quinze anos. Em 2010 o número de casos novos foi 34.894, dos quais 14.263 foram multibacilares, 2.461 foram crianças e 2.241 com grau 2 de incapacidade (WHO, 2011).

Em 2010 foram realizadas análises de casos notificados em 2007 a 2009 que confirmaram os clusters já existentes e identificaram o aparecimento de novo e grande cluster que abrange a região metropolitana de Fortaleza e Oeste do Rio Grande do Norte (Figura 4). O que indica a necessidade de implementação de estratégias em conformidade com a especificidade das regiões brasileiras (WHO, 2011).

Figura 3- *Clusters de casos novos/2008*



Fonte: Penna, 2008.

Figura 4 - *Clusters de casos novos em 2009*



Fonte: Penna et al., 2009

Apesar dessa realidade foi observado que, na última década, houve redução do coeficiente de alguns indicadores epidemiológicos importantes de hanseníase no Brasil, como por exemplo, o coeficiente de detecção em menores de 15 anos por 100 mil habitantes, que em 2000 era de 6.72 e reduziu para 5.22 em 2011. Resultado satisfatório, uma vez que esse

coeficiente reflete a existência de casos índices desconhecidos na população geral, que estão contaminando pessoas muito jovens (BRASIL, 2012).

Contribuem para a redução dos indicadores epidemiológicos as recomendações do Ministério da Saúde que envolve a descoberta de casos novos através da detecção ativa e passiva de contatos intradomiciliares (BRASIL, 2010), e o uso da vacina BCG em contatos intradomiciliares sem sinais clínicos da doença, independente da forma clínica do caso índice. A vacina tem a finalidade de estimular a resposta imunológica celular, que é eficaz no combate ao bacilo de Hansen (BRASIL, 2010).

Atualmente o foco dos programas não é mais a eliminação da doença e sim a redução da taxa de casos novos com grau 2 de incapacidade por 100 mil habitantes até o final de 2015 (WHO, 2011a). Modelos matemáticos fazem projeção que para 2020 aproximadamente um milhão de pessoas serão portadores de incapacidade grau 2 (RICHARDUS; HABBEMA, 2007).

3.3.1 Situação epidemiológica da hanseníase na Amazônia

A Amazônia é a maior floresta tropical úmida do planeta e com a maior biodiversidade, possui uma área de 5,5 milhões de Km² que abrange nove países: Brasil, Peru, Bolívia, Equador, Suriname e Guiana Francesa. No Brasil, a Amazônia legal se estende por nove Estados brasileiros: Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Roraima, Rondônia, Tocantins e parte do Mato Grosso. Na Região Norte a Amazônia é cortada pela linha do Equador, o clima é equatorial predominantemente quente e úmido, com temperaturas que oscilam entre 21° C e 42 °C, a média é de 29°C a 32°C. A grande umidade favorece a formação de nuvens que precipitam em forma de chuva, em geral abundantes. O desenvolvimento econômico e social da região ocupa o último lugar no ranking nacional, realidade que se manifesta nos indicadores de saúde que são pouco favoráveis, principalmente pela alta incidência de malária e hanseníase, entre outros (IBGE, 2010; INPE, 2012).

Por sua vez a hanseníase tem parte de sua história epidemiológica, e particularmente sua distribuição geográfica ligada a áreas de clima tropical, ou seja, elevadas temperaturas e intensas precipitações pluviométricas. Os casos novos de hanseníase acontecem, em sua

maioria, em países de clima tropical como o Brasil, Índia, Madagascar, Myanmar e Moçambique entre outros. Entretanto, essa doença já apresentou incidência elevada em regiões com clima temperado e frio, seu desaparecimento dessas áreas foi associado à mudança do perfil sócio-econômico da população que possibilitou elevação da qualidade de vida em todos os setores essenciais (MAGALHÃES; ROJAS, 2007). Estudos epidemiológicos apontam uma associação da hanseníase com condições desfavoráveis de vida relacionadas a fatores econômicos, sociais (higiênico-sanitárias) e biológicos, em virtude da grande maioria dos portadores de hanseníase viver em condições precárias de habitação, higiene e nutrição (TALHARI et al., 2006; WHO, 2007; MAGALHÃES; ROJAS, 2007).

Nesse sentido, a Amazônia tem todas as características climáticas para o desenvolvimento do *M. leprae*, além de características sociais como, baixa renda per capita, baixa escolaridade, ausência de saneamento básico, desnutrição, condições higiênicas desfavoráveis e movimentos migratórios. A distribuição geográfica de maior incidência da doença recai justamente na Amazônia e os fatores que contribuem para que isso aconteça são as barreiras físicas e sociais, que dificultam o acesso aos serviços de saúde, os aspectos demográficos e referentes à produção social do espaço geográfico que a fazem historicamente vinculada à evolução da endemia no Brasil (SILVA, et al., 2010).

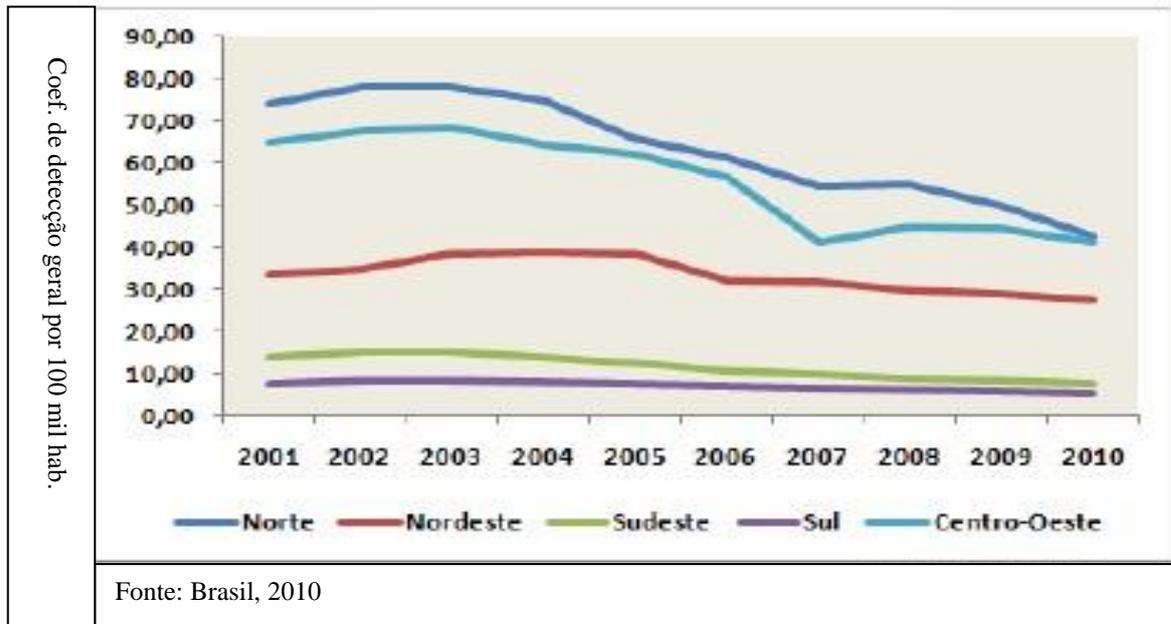
No ano de 2002 a situação numérica da hanseníase no Brasil era de 47.026 casos novos, a região Norte (Amazônia) contribuía com a maior fatia desses casos, 7,73 / 10.000 habitantes; seguida da região Centro Oeste com 6,61 casos novos / 10,000 habitantes; a região sudeste contribuía com a menor fatia com 1,46 casos novos / 10,000 habitantes. A região Sul era a única do Brasil que apresentava coeficiente exemplar de primeiro mundo mostrando uma quase nulidade de casos. No período de 2005 a 2007, a região Norte continuou apresentando coeficientes de detecção de casos novos mais elevados (6.57, 6.32 e 5.45 respectivamente) que as demais regiões do país (BRASIL/DATASUS, 2008).

Em 2007, os coeficientes de detecção de casos novos da população geral, evidenciaram um maior comprometimento da Amazônia Legal dentro do Estado brasileiro, em relação à hanseníase. Com 12.9% do total da população brasileira, foram detectados 15.532 casos novos (38.9%), distribuídos nos Estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará,

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

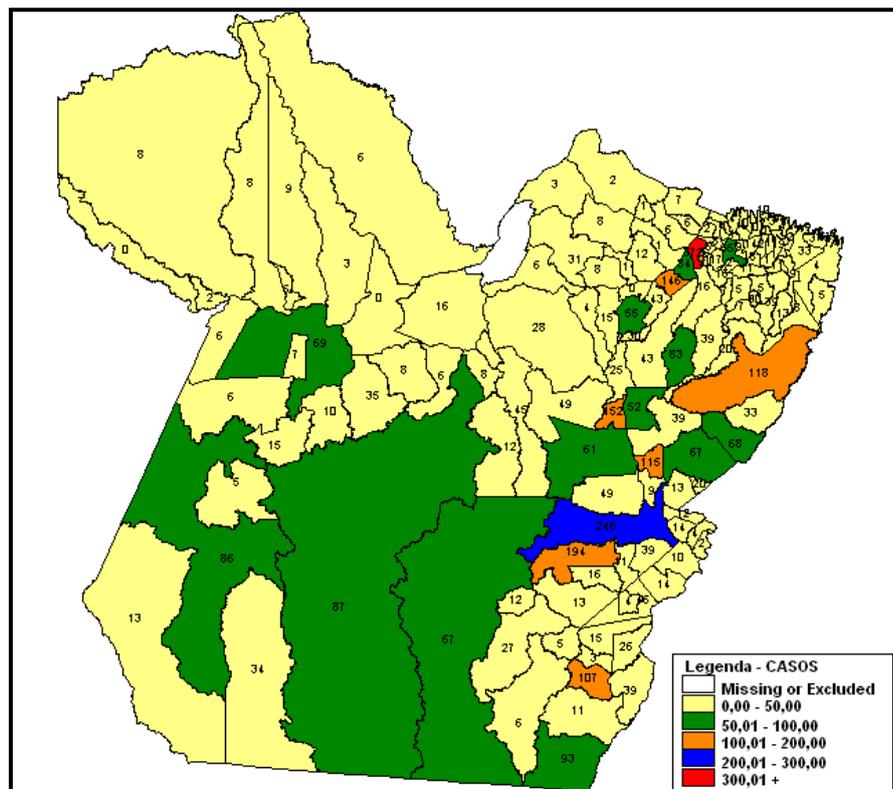
Roraima, Rondônia Maranhão e Tocantins (BRASIL, 2008). A Figura 5 mostra o comportamento da doença nos últimos dez anos.

Figura 5 - Comportamento da hanseníase de 2001 a 2010 nas regiões brasileiras



O Estado do Pará destaca-se como área de grande prevalência e de detecção de casos de hanseníase, ocupando o quinto lugar no ranking nacional no número de casos novos com 58,03 casos por cem mil habitantes no ano de 2008. O referido Estado possui cento e quarenta (143) municípios (Figura 6), divididos em treze (13) regionais de saúde, dos quais, com base no coeficiente da população geral, setenta e um (71) são considerados hiperendêmicos (49.65%) e trinta e quatro (34) municípios de muito alta endemicidade (23.77%), conforme os padrões nacionais da OMS ($\geq 40/100.000$ hab) e (20 - 39,99 / 100.000 hab), respectivamente (OMS; PARÁ, 2009; OMS, 2010).

Figura 6 - Endemicidade nos municípios do Estado do Pará



Fonte: SINAN-PARÁ, adaptado da base de dados, 2009.

Em 2010, o Estado do Pará apresentou queda no coeficiente de detecção geral; dos 58,03 casos registrados em 2008, passou para um pouco mais de 40 casos novos por cem mil habitantes, mantendo grau de hiperendemicidade e permanecendo no quinto lugar de números de casos no ranking nacional, contribuindo para que a região norte permaneça em primeiro lugar em casos de detecção geral. O coeficiente de detecção de casos novos de hanseníase em menores de 15 anos alcançou 19,11 casos por cem mil habitantes, colocando-o em incomodo segundo lugar (BRASIL, 2011). Áreas desse estado são consideradas de transmissão ativa, pois dos 143 municípios, 62 apresentam taxas de detecção elevadas em menores de 15 anos (BRASIL, 2011).

A taxa de detecção, apesar de apresentar limitações, é o indicador mais útil para avaliar a transmissão da hanseníase em uma área. A proporção da taxa de detecção em crianças é preocupante, pois, revela doença ativa e recente em uma comunidade. É, portanto, um indicador epidemiológico importante.

Ainda não existe prevenção efetiva contra a hanseníase através de uma vacina específica devido a impossibilidade do cultivo "in vitro" associado ao fato de que dentre todas as bactérias conhecidas, o *M. lepra*, apresenta o maior tempo de duplicação, em torno de 21 dias (DÜPRE, 1988; MARTELLI, 2002).

A vacina BCG, que é utilizada em saúde pública em comunicantes de portadores de hanseníase, foi criada com finalidade de combater, em crianças, as diversas formas de tuberculose, foi obtida de cepa atenuada do *Mycobacterium bovis* pelos pesquisadores Albert Camette e Camille Guérin que a utilizaram pela primeira vez na França em 1921, daí o nome do bacilo Calmette e Guérin. O uso da referida vacina no Brasil, iniciou na década de 70 com recomendação de ser aplicada em crianças de zero a quatorze anos, em duas doses, sendo 0,05 ml em menores de 3 meses e 0,1 ml em crianças acima de 3 meses até 14 anos. Na década de 80, uma portaria revoga a anterior e a aplicação passa a ser uma dose de 0,1 ml em crianças menores de 1 ano (DÜPRE, 1988).

Estudos realizados em diferentes localidades observaram efeito protetor da vacina BCG contra as formas contagiantes da hanseníase (BAGSHAWE et al., 1989; STANLEY et al., 1981). Outros estudos realizados por Ponnighaus et al. (1994); Orege et al. (1993); Tripathy (1983) demonstraram proteção mais efetiva da vacina BCG para hanseníase do que para tuberculose.

Existem pesquisas que divergem em a relação a eficácia da vacina nos comunicantes de hanseníase, e apontam baixa proteção da vacina nesses comunicantes (FINE et al., 1986; ABEL et al., 1990; MULIYIL et al., 1983). A variabilidade na proteção da vacina BCG tem sido atribuída á vários fatores, como: diferenças das cepas de BCG utilizadas, diferentes níveis de exposição das populações, imunidade proporcionada por outras micobactérias existentes nas diversas áreas do estudo (reação cruzada) e diferenças de metodologia dos estudos (ARBELÁEZ; NELSON; MUNÓZ, 2000). Apesar das divergências a vacina tem sido usada na prevenção das formas MB em contatos de casos índices de hanseníase, independente da forma clínica (DÜPRE, 1988).

Rodrigues et al., (1992), ao avaliar o efeito da vacina BCG em área de alta endêmicidade no Brasil, observou efeito protetor de 81%, ou seja, a proporção de pacientes

paucibacilares que apresentavam cicatriz foi significativamente superior aos pacientes multibacilares, sugerindo também variação da proteção de acordo com diferentes formas clínicas da hanseníase.

3.4 IMUNOLOGIA DA HANSENÍASE

O *M. leprae* é um patógeno intracelular que ao penetrar no organismo do hospedeiro provoca respostas imunológicas diferenciadas e complexas que ainda hoje são intrigantes e desafiantes para os pesquisadores, essas respostas dependem da pré-disposição genética do indivíduo e são traduzidas em um espectro das formas clínicas da hanseníase com predomínio de resposta imunológica celular ou humoral (KLATSER, 1994; MENDONÇA et al., 2008).

3.4.1 Resposta imunológica a patógenos intracelulares

A resposta imunológica é uma seqüência complexa de eventos moleculares e celulares que respondem de maneira sistemática contra determinado antígeno invasor do organismo. Os patógenos acessam o organismo por diferentes vias, como os epitélios da derme e das mucosas, em especial a do trato respiratório, e podem produzir doenças infecciosas por diferentes mecanismos (ABBAS, 2008; VOLTARELLI, 2009).

Existem dois tipos de resposta imunológica: a natural, também conhecida como inata, e a adquirida ou específica ou adaptativa. Os mecanismos iniciais de proteção (imunidade natural) não são antígeno-específicos, no entanto, forma-se um padrão funcional de acordo com a natureza do patógeno e com os genes expressos nas células que reconhecem e apresentam antígenos (MODLIN, 2002; ABBAS, 2008).

Dentre as células apresentadoras de antígenos (APCs) destacam-se as células dendríticas (DC). Estas células reconhecem regiões específicas e comuns a vários patógenos, através de receptores de superfície celular, conhecidos como Receptores Toll Like (TLR), por esse motivo foram denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Esses receptores estabelecem uma conexão entre a imunidade natural e a adquirida. Uma vez ativados, induzem a maturação de células dendríticas, que por sua vez, passam a expressar produtos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), assim como secretar

mediadores que vão determinar o perfil de diferenciação da resposta imunológica (ABBAS et al., 2008; DOAN et al., 2008).

Os linfócitos T, (T auxiliares, T citolíticos e T citotóxicos), também chamados de CTLs, possuem moléculas receptoras de antígeno localizadas na membrana celular, reconhecem e destroem antígenos específicos do tipo peptídeos antigênicos de microorganismos intracelulares, como vírus e algumas bactérias ligadas á proteína do hospedeiro, ou então, destroem a célula infectada. Mediante estimulação antigênica, as células T auxiliares liberam proteínas do tipo citocinas, cuja função, é estimular a proliferação e a diferenciação das células T, assim como promover ativação de outras células, como macrófagos, leucócitos inclusive células B (ROITTER et al., 1999; ABBAS, 2008).

Os linfócitos B, únicas células que produzem anticorpos, são mediadoras da imunidade humoral e especializadas em reconhecer antígenos extracelulares de diferentes tipos químicos através dos anticorpos, os quais neutralizam a infecciosidade dos microorganismos e os preparam para serem eliminados por mecanismos efetores distintos. Os anticorpos são moléculas presentes no sangue e secreções das mucosas (ABBAS et al., 2008).

Para que ocorra resposta específica é necessário que o antígeno entre em contato com célula apresentadora de antígeno (APCs). Essa célula, ao processar o material protéico dos antígenos, transforma-os em peptídeos, que posteriormente serão expressos na superfície celular. Dessa forma, os peptídeos ligados a molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) tornam-se especializados na apresentação de antígeno, transportam esses antígenos para órgãos linfóides e os apresenta aos linfócitos T auxiliares, dando início a resposta imunológica específica com objetivo de eliminar o antígeno (ROITTER et al., 1999; ABBAS, 2008; VOLTARELLI, 2009).

O complexo MHC pode ser de classe I ou II, variação que depende das características do antígeno. As proteínas de classe I do MHC são expressas por praticamente todos os tipos de células somáticas e utilizadas para apresentar substâncias às células TCD8, as quais na maioria das vezes são citotóxicas. As proteínas de classe II do MHC são expressas por macrófagos e outros tipos celulares, necessárias para apresentação do antígeno às células TCD4, e para a subpopulação de linfócitos T que inclui a maioria das células auxiliares. A

população de células TCD4+ é heterogênea, sendo constituída de duas subpopulações: Th1 relacionada com a defesa contra tumores, bactérias intracelulares e vírus e Th2 mais efetiva contra os helmintos (STITES et al., 2000; FAKHOURI et al., 2003; MODLIN, 2003).

Mediante infecção por microorganismos intracelulares as CDs e os macrófagos passam a produzir interleucinas do tipo IL-12 e IL-23 e elevados níveis de CD4, provocando a diferenciação de linfócitos T auxiliares, do tipo Th1, e produção de IL-2 e interferon-gama (IFN- γ) necessárias à formação do granuloma e eliminação dos microorganismos em questão. Os linfócitos T CD4 reconhecem antígenos oriundos dos vacúolos das APCs e promovem destruição das bactérias. Os linfócitos TCD8 reconhecem antígenos citosólicos associados à MHC de classe I, e destroem os macrófagos infectados (STITES et al., 2000; FAKHOURI et al., 2003; MODLIN, 2003; SHWARTZ, 2003).

3.4.2 Resposta imunológica na hanseníase

A hanseníase decorre da infecção causada pelo *M. leprae* nas células do sistema mononuclear fagocitário e células de Schwann, que segundo pesquisas, tem uma vida média longa, razão que explicaria o tropismo do bacilo pelas mesmas. A resposta imunológica específica desencadeada pelo *M. leprae* determina não só o curso da doença como suas diversas formas clínicas. Para o entendimento das manifestações clínicas e estruturais da hanseníase, se faz necessária a compreensão dos mecanismos das diferentes respostas imunológicas perante a infecção pelo *M. leprae* (FOSS, 1997; GOULART, 2002).

Quando da penetração do bacilo no organismo, a primeira linha de interação entre o *M. leprae* e o homem é mediada por receptores Toll-Like (TLRs). A resposta protetora que é gerada está relacionada à diferenciação de macrófagos e células dendríticas, assim como com a produção de interleucinas reguladoras, tais como, IL-12 e IL-23 (DERMANGEL; BRITTON, 2000).

O bacilo ao ultrapassar a barreira inicial da imunidade natural, encontrará os linfócitos T, células exterminadoras naturais ou natural killer (NK) e os macrófagos teciduais (KUBY, 2002; MODLIN, 2002). Exames histopatológicos em tecidos de portadores de

hanseníase multibacilar, mostraram carência de células dendríticas na derme e na epiderme, e consequente diminuição da resposta celular (QUARESMA et al., 2009).

Na hanseníase a proteção contra o *M. leprae* é dependente da função das células natural killer (NK) nos estágios mais iniciais da infecção. As células NK produzem enzimas que combatem os microorganismos como a granzima, perforina e granulicina, esta última com capacidade destrutiva direta para micobactérias. As células NK também secretam IFN γ quando sob estímulo da citocina IL-12 que é secretada por macrófagos infectados, estimulando a destruição intrafagolisossomal (MODLIN, 2000; DE LA BARRERA et al., 2004).

Os mecanismos imunológicos, na hanseníase, não estão totalmente esclarecidos, porém, sabe-se que o perfil de citocinas que tem se mostrado efetivo em debelar a infecção envolve resposta celular pelo linfócito T auxiliar (Th1), com prevalência de TNF- α , IFN- γ e IL-12. Por outro lado, o perfil Th2 (com expressão de IL-4, IL-5, IL-10 e Fator de Crescimento Transformante beta - TGF- β) é tido como agravante dos quadros graves da doença (Figura 7) (TALHARI; NEVES, 1997; FOSS, 1997; FOSS, 1999; KANG, LEE, CHAE, 2002; KRUTZIK et al., 2003; FAKHOURI et al., 2003; ABBAS, 2008).

Na infecção intracelular, ou seja, após a penetração do bacilo no macrófago, a resposta imunológica resistente *versus* suscetível parece ser regulada por duas sub-populações de linfócitos T, gerando as respostas Th1 e Th2 (YAMURA et al., 1991; SIELING; MODLIN, 1992). Dessa maneira, a resposta adaptativa é espectral e dependente da resposta celular do indivíduo (MODLIN, 1992).

As subpopulações de linfócitos T (CD $^{+4}$) que produzem citocinas IL-2 e IFN γ são chamadas de Th1, que aumentam a imunidade mediada por células. O IFN γ ativa os macrófagos, e a IL-2 estimula o crescimento de células T antígenos-específicas, resultando em doença mais controlada ou cura. Estudos imunohistológicos mostraram grande quantidade de IL-2 e IFN- γ em lesões TT, confirmando assim a importância dessas citocinas no estado de resistência do organismo para a hanseníase (FOSS, 1997).

A formação da subpopulação Th1 (Figura 7), passa a produzir citocinas, principalmente, IL2, IL12 e IFN γ . A IL2 induz a proliferação das próprias células Th1 e de linfócitos T citotóxicos, além de produzir a ativação de macrófagos, ampliando dessa maneira a resposta celular. A IL12, induz a produção de interferon gama (IFN γ) pelos linfócitos Th1. O IFN γ , inibe a expressão dos linfócitos Th2, favorecendo a imunidade por citotoxicidade celular e atividade de macrófagos. Os macrófagos presentes nas lesões inflamatórias produzem o fator de necrose tumoral (TNF α) que é fundamental para formação do granuloma, além de liberarem substâncias biologicamente importantes para aumentar a resposta celular, tais como: citocinas (IL-1, IL-6) e enzimas ampliando dessa maneira a resposta celular. No interior dos macrófagos acontecem modificações bioquímicas e enzimáticas que potencializam suas funções fagocíticas (TALHARI; NEVES, 1997; FOSS, 1999; FAKHOURI et al., 2003).

A resposta imunológica com predomínio do perfil de citocinas Th1 corresponde clinicamente às formas benignas, ou seja, não contagiantes da doença (TT, BT). (FOSS, 1997; OPROMOLLA, 2000; GOULART et al., 2002).

Os linfócitos T supressores (CD⁸), produzem as interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e Fator de Crescimento Transformante beta (TGF- β), geram resposta tipo Th2, que é humoral. Tanto IL-4, quanto IL-10 estimulam as células B, que por sua vez inibem a ativação de macrófagos, resultando em infecção progressiva (SIELING; MODLIN, 1994; MODLIN, 2002). A IL-10 também é responsável pela supressão da produção de citocinas pelos macrófagos ativados (TN α , IL-1, IL-6, IL-12) com consequente interferência na capacidade microbicida dessas células, por inibição da expressão do receptor co-estimulador CD23, indispensável na formação de radicais intermediários de oxigênio (ROI) e de nitrogênio (RNI). (YAMAMURA et al., 1991; MODLIN, 1992; FOSS, 1997; SANTOS, 2002).

Foi observado que a IL-4 tem papel imunorregulatório negativo importante na imunidade celular, pois inibe os receptores de IL-2, bloqueia a geração de óxido nítrico (NO) o qual é fundamental para destruição do bacilo de Hansen, o que pode levar ao aumento da proliferação bacteriana. Também foi observado que as IL-4, podem estar envolvidas no aumento de anticorpos contra o antígeno específico do *M.leprae* (anti-PGL-1) nos casos virchovianos (GOULART et al., 2003). O fator transformador do crescimento-beta (TGF- β)

destruído. A destruição resulta na forma TT da hanseníase que é uma forma de resistência alta, denominada de hanseníase tuberculóide. Quando o bacilo não é destruído, resulta na forma LL, que é de baixa resistência e de alta suscetibilidade, denominada de hanseníase lepromatosa (FOSS; GOULART; MINEO, 2000; STITES; TERR; PARSLOW, 2000; FAKHOURI et al., 2003).

O predomínio da resposta humoral ocorre por mecanismo de escape à oxidação intramacrofágica, provavelmente provocada pelos antígenos de superfície do *M. leprae* que são o glicolípido fenólico (PGL-1) e o lipoarabinomana (LAM), que produzem supressão na atividade macrofágica, possibilitando que o bacilo fique protegido no interior dessa célula, gerando com isso, forte resposta humoral não efetora na destruição e contenção do bacilo, levando a formação de anticorpos do tipo IgM, cuja importância se deve ao fato de serem específicos, possibilitando sua utilidade em estudos sorológicos (HUNTER; BRENNAN, 1981; HUNTER et al., 1982; VASCHULA, et al., 1989; FOSS, 1997).

3.5 SOROLOGIA ANTI-PGL-1: CONTRIBUIÇÕES NO CONTROLE DA HANSENÍASE

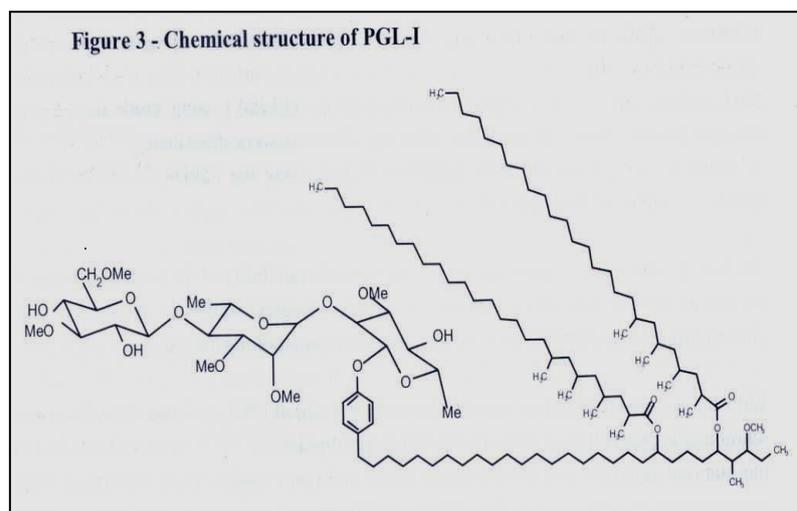
As micobactérias possuem antígenos que são agrupados em polipeptídeos, lipossacarídeos, glicolipopeptídeos e glicolípídeos fenólicos (PGL) I, II e III. Dentre esses, os glicolípídeos fenólicos são antígenos específicos do *M. leprae* (BRENNAN, 1981), os quais possuem capacidade de interferir na resposta imunológica celular do hospedeiro (HUNTER, 1982). São constituídos por um envelope lipídico, que protege a bactéria, ao qual é atribuído a responsabilidade pelo crescimento lento da mesma, pois, promove uma barreira para a difusão de nutrientes necessários ao crescimento bacteriano, chamada propriedade hidrofóbica (BERA; BANERJEE, 1989).

Um dos primeiros glicolípídeos específicos (antígenos) do *M. leprae* isolado de fígado de tatu por Young (1981) e caracterizado por Hunter e Brennan (1981) foi o glicolípido fenólico-1, também conhecido como PGL-1, que leva a formação de anticorpos das classes IgG e IgM. Estes pesquisadores publicaram a estrutura e antigenicidade do glicolípido fenólico-1, e cogitaram sua utilização como possível marcador químico do *M. leprae*. O PGL-1 é importante antígeno da cápsula externa do bacilo de Hansen, pois, é um antígeno específico, corresponde a 2% da massa total bacteriana (HUNTER; BRENNAN,

1981; VASCHULA et al., 1982). Também foi observado que os títulos de IgM, anti-PGL-1, têm correlação com as formas clínicas e com a atividade da doença hanseníca (BRENNAN; BARROW, 1980; BRENNAN; HUNTER, 1981).

A estrutura e a antigenicidade (Figura 8) desse antígeno (PGL-1), descoberta por processo de purificação é composta de um trissacarídeo, fenol, fitiocerol e de ácido micoseossídico, cuja combinação de açúcares é única para o bacilo de Hansen que são: 3,6 – di – O metil glicopira sonil; 2,3-di-O-metil rampiranosil e 3-O-metil ramnopiranosil (HUNTER; BRENNAN; FUJIWARA, 1982). A porção dimetilglicose terminal é a porção imunogênica da molécula, ou seja, é o epítipo dominante na resposta do anticorpo ao glicolípido fenólico, alvo para anticorpos do tipo IgM em pacientes virchowianos. Os anticorpos contra o PGL-1 são encontrados no soro dos pacientes hansenianos, mas, não no soro de indivíduos infectados por outras micobactérias. Desse modo, tendo sido reconhecido como determinante espécie-específica. Essa estrutura é degradada lentamente no interior dos tecidos infectados e pode levar a formação de uma massa duas vezes maior que a bactéria (CHO et al., 1983; YOUNG; BUCHANAN, 1983; BRETT et al., 1984).

Figura 8 - Estrutura química do PGL-1



Fonte: Vissa; Brennan, 2001.

Esse antígeno mobiliza a participação do sistema imunológico, favorecendo a sobrevivência do bacilo no interior dos macrófagos uma vez que está envolvido com a supressão da imunidade celular (HUNTER, 1982). As prováveis causas da supressão do

macrófago seriam: a) a capacidade em induzir o bloqueio da produção de derivados de oxigênio pelo macrófago, em especial o ânion superóxido (ROI) e do óxido nítrico (NO), necessários para destruição de patógenos intracelulares; b) a capacidade de interferir na produção de TNF- α . (YOUNG; BUCHANAN, 1983). Essas hipóteses foram comprovadas em um estudo com macrófagos de indivíduos saudáveis que, ao serem expostos ao PGL-1 apresentaram depressão da produção de TNF- α , essencial para formação do granuloma. Dessa forma, o PGL-1 provocaria uma resposta humoral através da interleucina – 4 e da antagonização das células “T” auxiliares, tipo1 (FOSS; CALLERA, 1993; YAMASHITA et al., 1993).

Uma retrospectiva sobre o desenvolvimento de anticorpos mostra que desde o início do século passado, pesquisadores já se preocupavam em desenvolver métodos e técnicas para o estudo de anticorpos específicos, como Eitner em 1906, que estabeleceu a reação de fixação do complemento utilizando material de hansenoma; também outras técnicas foram elaboradas como a de radioimunoensaio (MELSON; HARBOE; NAAFS, 1982).

Em 1978, Harboe et al. consideraram que a utilização da técnica de radioimunoensaio para detecção de anticorpos específicos do *M. leprae* poderia contribuir com os estudos epidemiológicos, como também auxiliar no diagnóstico de quadros clínicos atípicos. Os primeiros testes sorológicos descritos para hanseníase, radioimunotestes, utilizavam anticorpos fluorescentes de absorção (FLA-Abs) e imunoaglutinação, no entanto, possuíam baixa especificidade (ABE et al., 1980).

Posteriormente, foi lançada a técnica Ensaio Imunoenzimático (ELISA), esse novo recurso sorológico foi utilizado por Hunter et al. (1982) o qual usou antígeno glicolípido fenólico nativo ou purificado ou proteínas diferentes para o *M. leprae* e outras micobactérias. Esse antígeno nativo também apresentou restrições em decorrência da insolubilidade do PGL-1 nos meios aquosos (molécula bastante apolar), foram necessárias adaptações técnicas para o desenvolvimento de pesquisas em humanos, tais como: incorporação de lipossoma, tratamento detergente ou deacilação de soluções aquosas (YOUNG; BUCHANAN, 1983), sonicação e transformação em antígeno sintético hidrossolúvel e solubilização em solventes orgânicos (HUNTER et al., 1982; CHO et al., 1983; BRENNAN et al., 1983).

Foram produzidos sinteticamente compostos mono, di e trissacarídeo, conjugados a uma proteína carreadora soro albumina-bovina chamada BSA ligada a um radical octil (D-O-BSA) ou a um radical fosfato (T-P-BSA). Os que produzem uma melhor reatividade com soros de doentes são os resíduos di (D-BSA) e trissacarídeos (T-BSA) que tem açúcar não redutor 3,6-di-O-metilglicopiranosídeo. Dentre eles, o que tem sido utilizado em técnicas sorológicas com bons resultados, é o dissacarídeo sintético (CHANTEAU et al., 1988).

Esses novos análogos possibilitaram a realização de estudos utilizando a sorologia pelo método ELISA, para detectar a presença de anticorpos anti-PGL-1, sobretudo IgM. Dessa maneira, os antígenos sintéticos, PGL-1, passaram a ser usados em muitos estudos como ferramenta auxiliar na classificação da hanseníase, os quais mostraram que pacientes hansenianos do pólo virchowiano formam grandes quantidades de imunoglobulinas do tipo IgM, ou seja, títulos altos reagindo contra esse antígeno, podendo dessa maneira indicar possibilidade de diagnóstico precoce das formas bacilíferas (BUCHANAN, 1983; BACH, 1986; SANCHES, 1986).

Em 1982, Payne et al. ao realizarem estudos sorológicos com o antígeno PGL-1 do *M. leprae*, pela técnica de imunodifusão em gel, incorporaram o antígeno no interior de lipossomas e, observaram a presença de anticorpos específicos nos soros de doentes Virchowianos.

A partir do isolamento realizado por Young (1981) e caracterização do PGL-1 por Hunter e Brennan (1981), foram realizados testes por Cho et al. (1983) em um grupo de doentes hansenianos, em portadores de outras micobactérias, além de um grupo de controles sadios e observaram que houve predomínio do anticorpo do tipo IgM, o que fez supor que o PGL-1 tem a capacidade de estimular a produção do anticorpo IgM. Também concluíram que um teste, que dosasse IgM específico ao glicolípido do *M. leprae*, poderia indicar quimioterapia precoce, dessa maneira, contribuindo para diminuição do diagnóstico tardio.

Em 1984, Fujiwara et al. produziram um antígeno sintético constituído pelo próprio trissacarídeo específico do PGL-1 ligado a uma soro-albumina (BSA-bovine serum albumin), este, possui mesma especificidade antigênica do PGL-1 nativo. Fato comprovado em trabalhos que utilizaram antígenos sintéticos, assim como antígenos nativos em técnicas

sorológicas para pesquisa de anticorpos nos soros dos portadores de hanseníase e obtiveram resultados similares tanto com o antígeno sintético quanto com o nativo (CHANTEAU et al., 1988).

Em 1986, Bach et al. demonstraram que a sorologia anti-PGL-1 poderia ser útil no seguimento clínico de portadores de hanseníase, pois, foi observado que os níveis de anticorpos IgM diminuem ao longo do tratamento específico.

Em 1987, Menzel et al. realizaram estudo soroepidemiológico pelo método ELISA, em contatos intradomiciliares utilizando antígeno sintético análogo, observaram que em área endêmica de hanseníase pessoas sadias com exposição a doente multibacilar há mais de ano, apresentavam anticorpos anti PGL-1 em maior frequência do que contatos sadios de doentes paucibacilares e não contatos. Também em 1987, Chanteau et al. usando PGL-1 em estudo soroepidemiológico com finalidade de avaliar a utilidade desse teste e do antígeno, em vigilância de contatos, sugerem a possibilidade do teste ser útil para prever casos multibacilares entre os contatos.

Em 1989, Vaschula et al., observaram que o PGL-1 altera o mecanismo oxidativo do macrófago, impedindo-o de destruir os bacilos e de apresentar os determinantes antigênicos aos linfócitos. A eficácia da defesa é efetuada pelos macrófagos APC, que são capazes de fagocitar e destruir a bactéria. Portanto, o PGL-1 possui função supressora da atividade macrofágica, uma vez, que o *M. leprae* produzindo esses antígenos adquire mecanismo de escape contra a oxidação intramacrófago.

A persistência do antígeno PGL-1, em organismos com hanseníase, por longo tempo, é explicada como conseqüência da hidrofobicidade, ou seja, de sua insolubilidade em meio aquoso, ou pela incapacidade do macrófago em eliminá-lo (MILLER et al., 1987). Em conseqüência dessa persistência, a imunoglobulina do tipo IgM se encontra elevada no soro desses organismos. O aumento do número de anticorpos específicos anti PGL-1, tipo IgM e a elevada concentração do antígeno PGL-1 no sangue periférico, refletem a ativação da resposta humoral e a acentuada carga bacilar dos pacientes. Fato, que explica os elevados títulos de anticorpos do tipo IgM, em portadores MB- pólo VV, que reagem contra o antígeno específico, em torno de 98% de especificidade e 80% a 100% de sensibilidade, enquanto nos

portadores PB os títulos são baixos, nos quais a resposta celular é alta, fazendo com que os índices de sensibilidade caiam em torno de 30% a 60%, (KLATSER et al., 1996).

Foss et al. (1993) também observaram em uma análise sorológica de doentes hansênicos multibacilares, com antígenos cubanos, maior positividade nos títulos de anticorpos anti-PGL-1 do tipo IgM.

Em virtude dessas características apresentadas pelo antígeno, em 1996, Oliveira realizou os primeiros estudos de coortes em pacientes tratados com PQT/OMS/ 24 doses fixas e classificados operacionalmente como multibacilares (MB). Foram testados 165 pacientes, com média de cinquenta meses pós-alta, por meio de ensaio imunoenzimático padrão ELISA. O resultado revelou alto percentual de positividade para o teste anti PGL-1 (DO > 0,2 até 0,8) associado com IB positivo. A maioria dos pacientes pertencia à forma Virchowiana, sendo sugerido como grupo com maior risco de recidiva. Outros estudos têm documentado a aplicação do teste anti-PGL-1 para detecção de anticorpo anti-PGL-1, IgM, como mais uma possibilidade de detecção precoce de recidiva da doença (OLIVEIRA, 1996).

A detecção de anticorpos contra PGL-1 do *M. leprae*, com o fim de identificar pessoas nas quais os sinais clínicos não se tornaram evidentes, pode ser uma vantagem para a interrupção da transmissão da doença, uma vez, que os anticorpos refletem a carga bacilar de um indivíduo e podem propiciar o mapeamento sorológico e acompanhamento dos contatos que são úteis na detecção de casos novos (BÜHRER-SÉKULA et al., 1998; BAKKER, 2005).

Na visão de alguns pesquisadores, a sorologia tem um papel complementar na classificação de pacientes, monitoramento da eficácia terapêutica anti-hansênica, no diagnóstico precoce de recidiva, além de ser um indicador da magnitude da doença, como também um indicador de transmissão recente. Portanto, é um recurso importante que pode ser utilizado pelos profissionais quando existir dúvidas na clínica e em pesquisas soroepidemiológicas (BÜHER-SEKÚLA, 2000; BÜHER, 2003; MOURA et al., 2008).

Existem resultados divergentes que se contrapõem as vantagens da sorologia apontadas em alguns estudos, as mesmas se apóiam na peculiaridade de variáveis, como, diferenças genéticas, cepas de diferentes patogenicidades, características populacionais e

ambientais (KAZDA; IRGENS; KOLK, 1990; FINE; PONNIGHAUSE; BURGESS, 1988; SOEBONO; KLATSER, 1991).

3.6 SOROPOSITIVIDADE DO TESTE ANTI-PGL-1 PELO MÉTODO ELISA: PONTO DE CORTE

Os testes sorológicos, também conhecidos como imunoenaios são técnicas para detecção e quantificação de anticorpos ou de antígenos em organismo animal com finalidade diagnóstica (AGUADO et al., 1986). O termo Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi empregado pela primeira vez, em 1971 por Engvall e Perlmann, com objetivo de caracterizar um ensaio heterogêneo diferenciado dos métodos enzimáticos já existentes para a detecção de antígenos e de anticorpos. O método é capaz de avaliar a quantidade de anticorpos presentes em um indivíduo doente, cujo resultado final é expresso por um produto colorido analisado em densidade ótica (OD) (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

De acordo com a metodologia descrita por Brett (1986), o teste anti PGL-1 realizado pelo método ELISA é a técnica mais adequada para demonstrar a presença de anticorpos (Ac) contra o PGL-1. Necessita de soro padrão constituído de anticorpos IgM e uma enzima peroxidase, que em contato com o substrato produz uma reação onde acontecem as ligações antígeno- anticorpo. A intensidade dessas ligações revela-se pela formação de uma coloração azul, que quanto mais intensa, traduz um maior número de ligações. Nessa metodologia, o referido pesquisador utilizou placas de poliestireno com 96 poços revestidos pelo antígeno semissintético NT-P-BSA (trissacarídeo natural ligado ao radical fenol acoplado a soro albumina bovino) e identificou que os níveis séricos estão diretamente relacionados à carga antigênica do hospedeiro.

O teste sorológico anti-PGL-1, método ELISA, por ser método quantitativo necessita de parâmetro numérico que separe positivo de negativo. Parâmetro que segundo a OMS pode ser obtido através da média dos níveis de anti-PGL-1 somado duas vezes ou três vezes o Desvio Padrão. Preferencialmente os soros devem ser obtidos do sangue de indivíduos não contato de portador de hanseníase da área do estudo (MENZEL, et al., 1987).

Os primeiros estudos com o PGL-1 objetivaram determinar a sensibilidade e especificidade do teste, utilizaram para avaliação casos clinicamente comprovados como controles positivos (doentes) e amostras de sangue de áreas não endêmicas, não contato de hanseníase como controle negativo. O teste foi comprovadamente específico para hanseníase e mais sensível para os grupos multibacilares e em menor quantidade nos paucibacilares. (MENZEL, et al., 1987). Outros estudos realizados com o mesmo objetivo, encontraram especificidade mais elevada com patamares de até de 98% (CHO, et al., 1983; BRETT et al., 1986; BURGESS et al., 1988).

Trabalhos utilizando o PGL-1 como antígeno, pela técnica ELISA, demonstraram que a produção de anticorpos tem relação com o espectro da doença e que os IgM, são os que estão presentes em maiores títulos (CHO et al., 1983; YOUNG et al., 1984). Em junho de 1985, foi publicado um protocolo padrão para o teste ELISA com objetivo de evitar metodologias e procedimentos alternativos que pudessem afetar a sensibilidade e especificidade do teste (BÜHRER-SÉKULA, 2000).

Essas normas são seguidas por pesquisadores quando utilizam para a positividade de seus estudos, valor obtido a partir de amostras de sangue coletado da população saudável não contato do local onde será desenvolvido o estudo, ou, de outra localidade onde a população não seja contato de portadores de hanseníase. Dessas amostras é retirada uma média dos valores detectados, mais dois ou três desvios padrão (DP), como recomendado pela OMS.

Em trabalho de revisão sistemática com finalidade de avaliar a importância da sorologia anti-PGL-1 (ELISA), pesquisadores identificaram estudos que apresentaram diferenças no protocolo da sorologia como: diferentes antígenos, diferentes diluições, tamanho das amostras e diferenças nos pontos de corte (Figura 9) que pelo critério do estudo não deveria ser superior a 0,300 e nem inferior a 0,150 (GOULART et al., 2008).

Figura 9 - Série de estudos sorológicos e os diversos valores de pontos de corte.

Lista dos artigos e resumos, excluídos e respectivo motivo de exclusão.						
Ano	Autor	Antígeno	Diluição	Cut-off	Amostras	Motivo de exclusão
1983	Cho ²⁶	PGL-I nativo	ND	ND	87	PGL-I nativo
1983	Brett ⁵	PGL-I nativo	-	-	70	PGL-I nativo
1986	Bach ¹	PGL-I nativo	1/250	-	88	PGL-I nativo
1986	Levis ⁴⁹	PGL-I nativo	1/300	-	192	PGL-I nativo
1987	Chanteau ³⁹	ND-O-BSA	1/250	0.100	724	Cut-off < 0.150
1987	Menzel ⁵²	D-O-BSA	1/100	1.0	207	Cut-off > 0.300
1988	Wu ⁸⁵	ND-O-BSA	1/200	0.04	213	Cut-off < 0.150
1988	Chanteau ²¹	NTP	1/250	0.589	19	Cut-off > 0,300
1988	Lyons ⁵¹	PGL-I nativo	1/300	-	77	PGL-I nativo
1988	Fine ³⁷	DBSA	1/020	-	6.002	PGL-I nativo
1990	Hussain ¹⁴	DBSA	1/250	0.500	100	Cut-off > 0,300
1990	Saad ⁶⁶	PGL-I nativo	-	0.27	357	PGL-I nativo
1990	Bagshawe ²	PGL-I nativo	1/100	0.200	960	PGL-I nativo
1991	Cho ²⁴	ND-O-BSA	1/300	0.200	101	Pacientes tratados
1991	Soebono ⁷⁰	PGL-I nativo	-	0.180	2.430	PGL-I nativo
1991	Chujor ²⁷	PGL-I nativo	1/500	-	147	PGL-I nativo
1992	Sticht-Groh ⁷²	DBSA	1/200	0.200	245	Comparar buffer
1992	Chin-A-Lien ⁵⁰	DBSA	-	0.150	10	Pacientes tratados
1993	Prakash ⁶⁰	NT-P-BSA	-	1.16	65	Cut-off > 0,300
1993	Yamashita ⁸⁶	PGL-I nativo	1/250	0.200	214	PGL-I nativo
1993	Foss ³⁹	PGL-I nativo	-	-	47	PGL-I nativo
1994	van Beers ⁷⁸	NT-P-BSA	-	0.380	1.302	Cut-off > 0,300
1994	Soares ⁶⁹	ELISA	1/050	0.199	562	Sem classificação
1998	Stefani ⁷¹	DBSA	1/300	0.2	255	Pacientes tratados
1998	Kumar ¹⁸	PGL-I nativo	-	0.23	698	PGL-I nativo
1998	Cunha ²⁸	PGL-I BSA	-	0.20	272	Pacientes tratados
2001	Cho ²⁵	ND-O-BSA	1/300	-	101	Pacientes tratados
2002	Wu ⁸⁴	ND-O-BSA	-	-	1.061	Pacientes tratados
2003	Bührer-Sékula ¹⁴	NT-P-BSA	1/050	-	498	Tamanho da amostra
2005	Cardona-Castro ¹⁶	PGL-I nativo	1/040	0.394	248	Cut-off > 0.300
In Press	Schruring ⁶⁸	NT-P-BSA	-	0.200	864	Pacientes tratados
In Press	Brito ⁷	NT-P-BSA	1/050	-	208	Pacientes tratados

Fonte: Goulart et al., 2008.

Estudo realizado em Goiás em área considerada endêmica para hanseníase, com objetivo de avaliar o anti-PGL-1 como marcador de reação hansênica, identificou ponto de corte de absorbância $\geq 0,200$ como positivos, com base nas amostras de sangue de 127 controles sadios residentes no local (STEFANI et al., 1998).

Uma pesquisa realizada pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) com finalidade de avaliar os níveis de anti-PGL-1 nas diversas formas de hanseníase, utilizou como controle, uma amostra de 47 indivíduos doadores de sangue e obteve um ponto de corte de 0,253 (YAMASHITA, 1999).

Pesquisadores do Instituto Alfredo da Mata na cidade de Manaus (AM), analisando níveis de anti-PGL-1 em doentes hansenianos, obtiveram a partir das amostras de sangue de 112 doadores saudáveis dessa cidade, valor do ponto de corte de OD=0,250; correspondendo ao valor médio dos níveis sorológicos de anti-PGL-1 mais duas vezes o desvio padrão (DP), segundo padrões da OMS (BÜHRER-SÉKULA, 2000).

No Estado do Pará, Amador (2004) avaliando soropositividade anti-PGL-1(ELISA) em contatos de portadores de hanseníase em cinco municípios hiperendêmicos, utilizou ponto de corte determinado por Bühner de 0.2. O estudo de Barreto et al., (2011) analisando soropositividade anti-PGL-1 (ELISA) em escolares de área endêmica do nordeste paraense, estabeleceu ponto de corte de 0.295 a partir de amostras de sangue de 14 doadores não contato de portador de hanseníase, usando a norma da OMS de acrescentar mais três (3 DP) a média dos níveis de anti-PGL-1 encontrados nas amostras.

Pelo exposto, observa-se que os pesquisadores estabelecem o ponto de corte de suas respectivas pesquisas soropidemiológicas, com base em pequenas amostras de controles saudáveis ou utilizam ponto de corte já estabelecido em pesquisa anterior de outros locais independente da endemicidade da doença. Dessa maneira, reafirma-se a importância de se conhecer o perfil sorológico anti-PGL-1 em áreas de elevada endemicidade em hanseníase no Estado do Pará, e então identificar um ponto de corte para sorologia anti-PGL-1 pelo método ELISA que corresponda a realidade endêmica das áreas do estudo.

Ressalta-se também, que estudos demonstraram que em geral, 10% a 30% dos indivíduos saudáveis que residem em áreas consideradas endêmicas para hanseníase, apresentam anticorpos anti-PGL-1 na corrente sanguínea (FINE, et al.,1987; MENZEL, et al., 1987; SOEBONO; KLATSER, 1991). No entanto, existe uma tendência demográfica de soropositividade para o isótipo IgM mais alta entre mulheres de todas as idades e jovens de ambos os sexos (MADDISON; STEWART, 1975). Portanto a identificação de níveis mais

elevados de anti- PGL-1 nessas populações não significa necessariamente infecção pelo *M. leprae*, pode ser característica fisiológica do sistema imunológico (BRETT, 1984 ; BÜHRER, 2000).

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo analítico do tipo transversal, com enfoque em testes diagnósticos.

4.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

A população do estudo foi composta por doadores de sangue, que voluntariamente procuram os hemocentros do Estado do Pará nos momentos de campanha ou fora delas. A escolha dessa população específica, considerada sadia, objetivou evitar possíveis reações cruzadas no momento do teste, dessa maneira, obedeceu a critério adotado por pesquisadores que realizam pesquisas sorológicas, na hanseníase, para controle dessas reações (MENZEL; HARBOE, 1987; FOSS et al., 1993).

Os hemocentros do Estado do Pará são em número de quatro (4) e divididos por áreas de gestão: Belém (Área-1), Castanhal (Área-2), Santarém (Área-3) e Marabá (Área-4); os quais recebem demanda populacional dos municípios que estão geograficamente à eles subordinados. Por sua vez, o Estado do Pará possui treze (13) regionais de saúde, cuja finalidade é descentralizar as ações de saúde e melhorar a qualidade dos serviços. Os hemocentros estão localizados em cidades pólos que pertencem as regionais de saúde.

Para estimativa da população de doadores/ano (N) foi usado o número total de doadores do ano de 2009, que foram: Belém- 5.216; Castanhal- 462; Santarém-451 e Marabá-442 (HEMOPA, 2009). Com base nessa população, calculou-se o tamanho das amostras (n) de cada hemocentro necessárias para desenvolver a pesquisa, conforme especificado abaixo. Para o cálculo amostral utilizamos a fórmula estatística (FONTELLLES, 2012).

$$TA = \frac{N}{1 + [(N-1) \times 0.05^2]}$$

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

- 372 doadores de sangue do Hemocentro Belém (Área-1), responsável por municípios pertencentes as seguintes regionais de saúde: 1ª, 6ª, 7ª, 8ª e 13ª.
- 215 doadores de sangue do Hemocentro Castanhal (Área-2), responsável por municípios pertencentes as seguintes regionais de saúde: 2ª, 3ª, 4ª e 5ª.
- 212 doadores de sangue do Hemocentro Santarém (Área-3), cujos municípios de sua responsabilidade fazem parte das regionais de saúde á saber: 9ª e 10ª.
- 210 doadores de sangue do Hemocentro Marabá (Área-4) fazem parte de sua área de competência, municípios das seguintes regionais de saúde: 11ª, 12ª, 10ª e 6ª.

A amostra foi composta de 1.001 doadores de sangue (Quadro 1), devidamente triados pelos técnicos dos respectivos Hemocentros através de protocolo próprio para seleção de doadores e de exames pré-doação e pela pesquisadora juntamente com auxiliares de pesquisa previamente treinados com finalidade de identificar doadores não contato de portador de hanseníase.

Quadro 1 - Amostra da população do estudo, doadores de sangue, hemocentros do Estado do Pará. Campanhas, 2009-2010.

Hemocentros	População/ano	Amostra/campanha
Belém	5.216	353
Castanhal	462	322
Marabá	442	189
Santarém	451	137
Total	6.571	1001

Fonte: Hemocentros do Estado do Pará.

4.2.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo doadores de sangue da faixa etária de 18 a 60 anos de idade considerados sadios, de todas as raças e sexo, que não tiveram antecedentes de convívio

domiciliar com o portador de hanseníase e que de maneira voluntária, manifestaram interesse em participar do grupo a ser pesquisado após esclarecimento grupal a respeito do objetivo da pesquisa. Posteriormente e individualmente foi lido e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

Foram excluídos menores de 18 anos e maiores de 60 anos de idade e os que não manifestaram interesse em participar do grupo em questão, também foram excluídos os doadores que foram contato domiciliar de portador de hanseníase.

4.3 CARACTERÍSTICAS DA ÁREA DO ESTUDO

O Estado do Pará está localizado na Região Norte, espaço da floresta equatorial onde as consequências ambientais e sociais de uma colonização desordenada são as derrubadas das matas, pelas queimadas, e das árvores para fins lucrativos, poluição dos cursos das águas dos rios por garimpeiros, conflitos pela posse da terra e alterações no curso dos rios para construção de hidroelétricas, entre outros, gerando efeitos danosos de toda ordem para a população principalmente para saúde.

Devido a sua grande extensão territorial, o Pará estava dividido em seis Mesorregiões e treze Regionais de Saúde (microrregiões) com seus respectivos municípios, até final de novembro de 2010, quando por determinação da Comissão Intergestores Bipartide do Estado do Pará- CIB/PA, através da Resolução nº 215 de 29 de novembro de 2010 (Anexo D), a divisão do Estado foi alterada para oito Mesorregiões e vinte e três Regiões de Saúde. Esta pesquisa utilizou a resolução anterior, uma vez que o Hemopa ainda trabalhava com base na mesma. A finalidade da divisão em Mesorregião é para integrar a organização, planejamento e a execução de funções e ações públicas de interesse comum com bases econômicas, sociais e de saúde.

Cada Mesorregião tem um município pólo, dentro das Microrregiões, que serve de apoio aos demais em relação às demandas de maior complexidade, que se não solucionadas são enviadas para o pólo central que é Belém, principalmente os casos de saúde.

1. Mesorregião de Belém —→ Microrregião Metropolitana de Belém que engloba:

1ª Região de Saúde: Ananindeua, **Belém**¹, Benevides, Marituba, Santa Bárbara.

6ª Região de Saúde: Abaetetuba, Barcarena, Igarapé- Mirim.

13ª Região de Saúde: Baião, Cametá, Limoeiro do Ajuru e Oeiras do Pará.

2. Mesorregião do Nordeste Paraense → Microrregião Nordeste Paraense composta das:

2ª Regional de Saúde: Acará, Bujarú, Colares, Concórdia, Santo Antonio do Tauá, Santa Isabel do Pará, São Caetano de Odivelas e Vigia.

3ª Regional de Saúde: **Castanhal**², Curuçá, Igarapé-Açú, Magalhães Barata, Maracanã, Marapanim, São Domingos do Capim, São Francisco do Pará, São João da Ponta e Terra Alta.

4ª Regional de Saúde: Augusto Corrêa, Bonito, Bragança, Capanema, Cachoeira do Piriá, Nova Timboteua, Ourém, Peixe-Boi, Primavera, Salinópolis, Santa Luzia do Pará, Santarém Novo, São João de Pirabas, Tracuateua e Viseu.

5ª Regional de Saúde: Aurora do Pará, Capitão poço, Garrafão do Norte, Ipixuna do Pará, Irituia, Mãe do Rio, Nova Esperança do Piriá, Paragominas, Santa Maria do Pará e São Miguel do Guamá.

3. Mesorregião do Marajó → Microrregiões compostas pelas seguintes Regionais de Saúde:

7ª Regional de Saúde: Afuá, Cachoeira do Arari, Chaves, Ponta de Pedras, Salvaterra, Santa Cruz do Arari, São Sebastião da Boa Vista e Soure.

8ª Regional de Saúde: Anajás, Breves, Bagre, Currealinho, Melgaço e Portel.

Os municípios dessas microrregiões são assistidos nas demandas mais complexas, por Belém.

4. Mesorregião do Baixo Amazonas → Microrregiões compostas pelas seguintes Regionais:

9ª Região de Saúde: Alenquer, Almerim, Aveiro, Belterra, Curuá, Faro, Itaituba, Jacareacanga, Juruti, Monte Alegre, Novo Progresso, Oriximiná, Placas, Prainha, Rurópolis, **Santarém**, Terra Santa e Trairão.

¹ Município pólo da 1ª, 6ª, 7ª, 8ª e 13ª Regionais de Saúde.

² Município pólo da 2ª, 3ª, 4ª e 5ª Regionais de Saúde.

10ª Região de Saúde: Altamira, Anapú, Brasil Novo, Porto de Móz, Senador José Porfírio, Uruará e Vitória do Xingu.

5. Mesorregião do Sudeste Paraense → Microrregião que engloba a seguinte Regional:

11ª Regional de Saúde: Abel Figueiredo, Breu Branco, Bom Jesus do Tocantins, Brejo Grande do Araguaia, Curionópolis, Canaã dos Carajás, Dom Eliseu, Goianésia do Pará, Itupiranga, Jacundá, **Marabá**, Novo Repartimento, Palestina do Pará, Parauapebas, Piçarra, Rondon do Pará, São Domingos do Araguaia, São Geraldo do Araguaia, São João do Araguaia e Tucuruí.

6. Mesorregião do Sudoeste do Pará → Microrregião Sudoeste é assistida por Marabá.

12ª Regional de Saúde: Água azul do Norte, Bannach, Conceição do Araguaia, Cumarú do Norte, Floresta do Araguaia, Ourilândia do Norte, Pau Darco, Redenção, Rio Maria, Santa Maria das Barreiras, Santana do Araguaia, São Felix do Xingu, Sapucaia, Tucumã e Xinguara.

Os municípios de Tailândia e Pacajá (6ª e 10ª Regionais de Saúde respectivamente), também são assistidos em suas demandas mais complexas pelo município de Marabá.

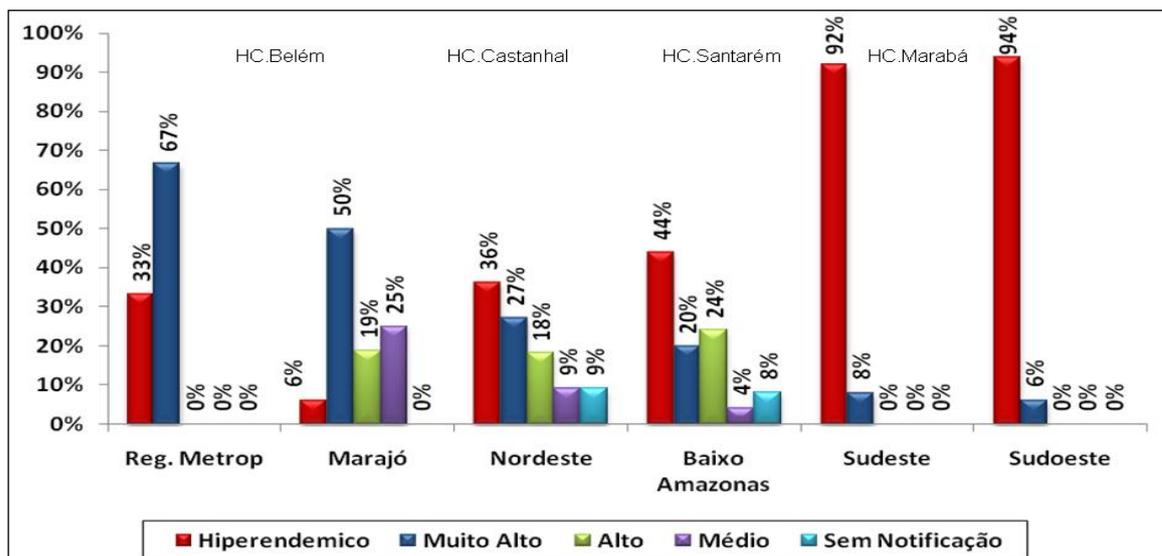
Em relação à doença hanseníase, dados da Secretaria de Saúde do Estado do Pará, (PARÁ, 2010) mostraram que as mesorregiões que fizeram parte do estudo apresentam a seguinte graduação de endemicidade: alta endemicidade, muito alta endemicidade e hiperendêmico para hanseníase. A maioria dos municípios das mesorregiões sudeste (92%) e sudoeste (94%) são hiperendêmicos (Figura 10). Os municípios onde foram realizadas as campanhas de doação de sangue, e de onde foram retiradas as amostras de sangue para o estudo, apresentam elevados coeficientes de detecção geral, segundo dados do DATASUS (2010), (quadro 2).

Quadro 2 - Coeficientes de detecção geral nos municípios do estado do Pará que fizeram parte do estudo, ano- 2009.

Municípios	Caso Novo	População	Coef. de detec.	Parâmetro	Hemocentro
Belém	449	1, 392, 031	32 ,02	Muito Alto	Belém
Castanhal	80	173, 096	46, 21	Hiperendêmico	Castanhal
Igarape-Açú	14	35, 236	39,73	Muito Alto	Castanhal
Santa Isabel	19	59, 476	31, 94	Muito Alto	Castanhal
Breu Branco	62	52, 497	118, 10	Hiperendêmico	Marabá
Parauapebas	268	153, 942	174, 09	Hiperendêmico	Marabá
Santarém	76	294, 774	25, 78	Muito Alto	Santarém
Total	971	771, 020, 031	475, 56		

Fonte: DATASUS/SINAN, 2010.

Figura 10 - Coeficientes de endemicidade de hanseníase nas mesorregiões do Estado do Pará



Fonte: Adaptado de dados fornecidos pela SESPA-PA, 2010

4.4 INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

Fizeram parte da amostra da pesquisa, doadores de sangue não contato intradomiciliar de portadores de hanseníase, residentes em áreas endêmicas do Estado do Pará

independente da classificação epidemiológica (alta, muito alta e hiperendêmica). Entende-se como contato intradomiciliar o indivíduo que residiu ou reside no mesmo domicílio de um portador de hanseníase no período mínimo de três meses, durante os cinco anos anteriores à data do diagnóstico, independente de ter ou não laços consangüíneos com o mesmo. Para a entrevista de seleção dos participantes do estudo, foi aplicada uma ficha epidemiológica com dados gerais de identificação, local de residência e cicatriz de vacina BCG (Apêndice B). Alguns desses dados como sexo, idade, e cicatriz de vacina BCG (variáveis independentes) foram correlacionados com os níveis sorológicos encontrados, uma vez que, essas variáveis podem interferir nos níveis de anticorpos anti-PGL-1 (IgM).

4. 5 PROCEDIMENTOS DE CAMPO

Inicialmente o projeto foi apresentado aos gestores do Hemopa- Belém, que é a sede responsável pela coordenação dos demais hemocentros do Estado do Pará, com fim de solicitar autorização para realizar a pesquisa em todos os hemocentros com os doadores de sangue, no período das campanhas internas e externas em virtude da certeza de maior demanda de doadores.

4.5.1 Seleção dos doadores

Após a triagem de rotina dos candidatos á doadores de sangue, realizada pelos técnicos do Hemopa, aconteceu a seleção dos participantes da pesquisa, na ante- sala da coleta de sangue, no grupo das pessoas identificadas como aptas para a doação, procedimento que foi realizado pela pesquisadora e seus auxiliares de pesquisa. Antes do contato individual com cada doador foi realizado um esclarecimento grupal da finalidade da pesquisa, objetivando sensibilizar os prováveis participantes. Subsequente a esse contato grupal foi realizada entrevista individual com os voluntários e processada a leitura do documento contendo o termo de consentimento livre e esclarecido, após, foi assinado o referido termo pelos participantes.

4.5.2 Procedimento da coleta de sangue

O procedimento de coleta de sangue, para realizar a sorologia, foi executado pelos técnicos do Hemopa no momento da retirada de sangue de veia calibrosa para a doação. Esse procedimento obedece a um protocolo interno do Hemopa, que exige técnica asséptica.

Foi colhido cinco ml de sangue venoso de veia periférica com vacuotiner sem anti-coagulante, após adequada anti-sepsia do local. Os fracos previamente identificados contendo o material (sangue-5 ml) foram acondicionados em caixas térmicas em temperatura adequada (4°C), e transportados para a sala de centrifugação do Hemopa da localidade onde aconteceu a campanha de doação para o processo de centrifugação. As amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos em centrífuga calibrada e o soro obtido foi colocado em frascos com tampa bem acondicionados, e, conservados em *freezer* temperatura de -20°C, posteriormente, foram novamente colocados em caixas térmicas em temperatura de 4°C transportados por via aérea e terrestre para o Instituto Evandro Chagas (IEC) onde foi realizada a pesquisa de anticorpos IgM contra PGL-1 do *M. leprae* por meio do método ELISA (Anexo C).

4.5.3 Procedimentos laboratoriais para a sorologia - ELISA

Todo procedimento de pesquisa de anticorpos IgM contra PGL-1 do *M. leprae* por meio do método ELISA contou com o apoio técnico e científico de pesquisador responsável pelo laboratório de hanseníase do IEC, juntamente com seus auxiliares de laboratório e pela autora do estudo.

O protocolo de sorologia pelo método ELISA utilizado pelo Instituto Evandro Chagas segue os padrões norteados por Bühner- Sékula (1988), (Anexo C) adota o antígeno NT-P-BSA (trissacarídeo natural ligado a um radical fosfato e ligado á soro-albumina bovina) para sensibilização das placas de ELISA, o qual é cedido pelo Prof. Fujiwara da Universidade de Nara- Misasagi-Cho Nara, Japão. Os outros insumos necessários para o desenvolvimento da técnica foram cedidos pelo IEC.

A composição do antígeno é uma fração semi-sintética (NT-P-BSA – Natural trisaccharide + Phosphate + Bovine serum albumin) do Glicolípido fenólico I (PGL-I) do *M.*

leprae, antígeno de parede celular espécie-específico desta micobactéria. Usa-se um conjugado IgM anti-humano ligado a uma enzima- a peroxidase que quando em contato com o substrato (tetrametilbenzidine –TMB) converte a reação em cor azul que, quando bloqueada pelo ácido sulfúrico (H₂SO₄) torna-se amarela.

De forma breve a técnica pode assim ser descrita: placas NUNC de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno semi-sintético Trisacáride Natural ligado a um radical Fosfato ligado a albumina bovina (NT-P-BSA), lavadas com PBSTween a 0,1% e bloqueadas com 100uL de solução de PBST a 1% de BSA, incubadas a 37°C por 1 hora. Adicionou-se soro de pacientes previamente diluídos com solução de PBST a 10% de soro normal de cabrito (NGS) em concentração de 1: 300 e novamente incubadas a 37°C por 1 hora. As placas foram novamente lavadas com PBST quatro vezes e então se adicionou 50 uL do conjugado anti-IgM humana com a enzima Peroxidase em concentração de 1:2000 e incubou-se novamente a 37°C por 1 hora. As placas foram novamente lavadas quatro vezes com PBST e foi adicionado o substrato tetrametilbenzidine (TMB- Invitrogen) e as placas foram Incubadas em temperatura ambiente e no escuro por aproximadamente 30min. Dependendo do substrato este tempo varia bastante. A reação foi parada com a adição de 50 uL da solução de ácido sulfúrico 2,5N de H₂SO₄ no soro padrão apresentou absorvância de 450nm. Amostras consideradas positivas apresentaram média de absorvância ≥ 0.2 e as negativas ≤ 0.2 (BÜHRER-SÉKULA, 2008).

Todos os soros foram testados em duplicata e os resultados de ELISA foram expressos pela média das absorvâncias, o valor final da densidade ótica (DO) de cada amostra de soro foi calculado subtraindo o valor DO dos poços revestidos com NT-P-BSA do valor DO dos revestidos com BSA, dessa maneira foram eliminadas as ligações inespecíficas, que poderiam interferir na precisão e na sensibilidade do teste.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram estruturados em um banco de dados no programa Microsoft Excel 2007. Posteriormente foram analisados no programa Bioestat 5.0 para a geração de resultados estatísticos que comprovassem a associação de variáveis pertinentes ao estudo, considerando o intervalo de confiança (IC) 95% e nível α 5% (p-valor $\leq 0,05$), isto é,

um achado seria considerado estatisticamente significativo se valor de “p” fosse menor ou igual a 0,05 e sem significância estatística se esse valor de “p” fosse maior que 0,05.

Para a confirmação da hipótese de nulidade (H_0) considerou-se $p > 0,05$ e para a rejeição, $p \leq 0,05$. Se a hipótese de nulidade fosse aceita, significaria dizer que as variáveis envolvidas no teste não estariam associadas, ou seja, não exerceriam nenhuma influência uma sobre a outra. Caso a hipótese de nulidade fosse rejeitada, optar-se-ia pela hipótese alternativa (H_1), a qual afirmaria que as variáveis estariam relacionadas entre si.

O teste G e o teste Qui-quadrado foram utilizados para observar as modalidades dispostas em tabelas de contingência $l \times c$, onde se determinou as proporções observadas nas diferentes categorias e significância estatística.

O teste t, foi aplicado para a análise dos níveis de anticorpos anti-PGL-1 nas amostras dos doadores de sangue entre os hemocentros estudados e entre os municípios rejeitando-se ou aceitando-se a hipótese de nulidade conforme os valores de “p” obtidos, possibilitando assim, associações com dados epidemiológicos referentes á endemia hansênica e dados demográficos.

A correlação linear de Pearson foi utilizada para verificar a associação linear entre níveis de anti-PGL-1, e a variável idade pertinente ao estudo, a qual verificou a medida através do grau e direção do coeficiente de correlação linear (r). O coeficiente de correlação linear de Pearson pode variar de -1 a $+1$, e quanto mais próximo desses valores, mais forte é a associação entre as variáveis estudadas. Um escore próximo aos valores zero indica uma fraca associação, e quando se obtém o valor zero, indica ausência total de associação entre as variáveis em análise.

A soropositividade foi obtida pela proporção de positivos na amostra da população de cada hemocentro. A soroprevalência foi calculada por meio da proporção da população de soropositivos de cada hemocentro, pelo total da população de cada hemocentro no período de um ano.

Para identificar o ponto de corte para o Estado do Pará, nas amostras deste estudo, utilizou-se as normas da OMS, e, que também foi o mesmo recurso usado por Bürher (1998),

quando da identificação do ponto de corte que subsidia várias pesquisas locais e nacionais (≥ 0.2). É o método da média dos níveis de anti-PGL-1 encontrado nas amostras mais duas (2) vezes o desvio padrão (SD). O resultado possibilitou fazer analogia com o ponto de corte que é usado (≥ 0.2).

4.7 NORMAS ÉTICAS

Esta pesquisa foi submetida e aprovada pelo comitê de ética do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará - NMT/UFPA, através do protocolo 050/2008 (Anexo B). A referida pesquisa atende a determinação da resolução 196/96-CNS/MS, que estabelece diretriz e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Os indivíduos que concordaram em participar do estudo, após esclarecimento claro e objetivo receberam, leram e/ou ouviram o conteúdo do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

4.8 AVALIAÇÃO DE RISCO/BENEFÍCIO

O estudo pode ser considerado de baixo risco, apesar dos procedimentos que foram realizados serem considerados invasivos, uma vez que são padronizados e foram conduzidos por profissionais treinados, portanto, não causando nenhum dano ao paciente.

5 RESULTADOS

A análise descritiva das características de um total de 1001 doadores de sangue dos quatro hemocentros do Estado do Pará, que fizeram parte do estudo, mostrou que a maior demanda de doadores ocorreu nos hemocentros de Belém (35,3%) e Castanhal (32,2%), o maior percentual de doadores foi do sexo masculino (69,7%), com grande predomínio de adultos jovens (72,7%). Pouco mais da metade dos doadores de sangue, tinha escolaridade de ensino médio (58,3%), (Tabela 1).

Tabela 1 - Características gerais da amostra, doadores de sangue, segundo dados epidemiológicos. Hemocentros/ Pará, 2009-2010.

CARACTERÍSTICAS	n	%
Hemocentro		
Belém	353	35,3
Castanhal	322	32,2
Marabá	189	18,9
Santarém	137	13,7
Total	1001	100,0
Sexo		
Masculino	698	69,7
Feminino	303	30,3
Total	1001	100,0
Idade (anos)		
≤ 21	143	14,4
22 a 45	722	72,7
46 a 60	122	12,3
> 60	6	0,6
Total	993*	100,0
Escolaridade		
Analfabeto	5	0,5
Ens. Fundamental	229	22,9
Ens. Médio	582	58,3
Ens. Superior	182	18,2
Total	998**	100,0

*oito indivíduos não possuíam dados sobre a idade

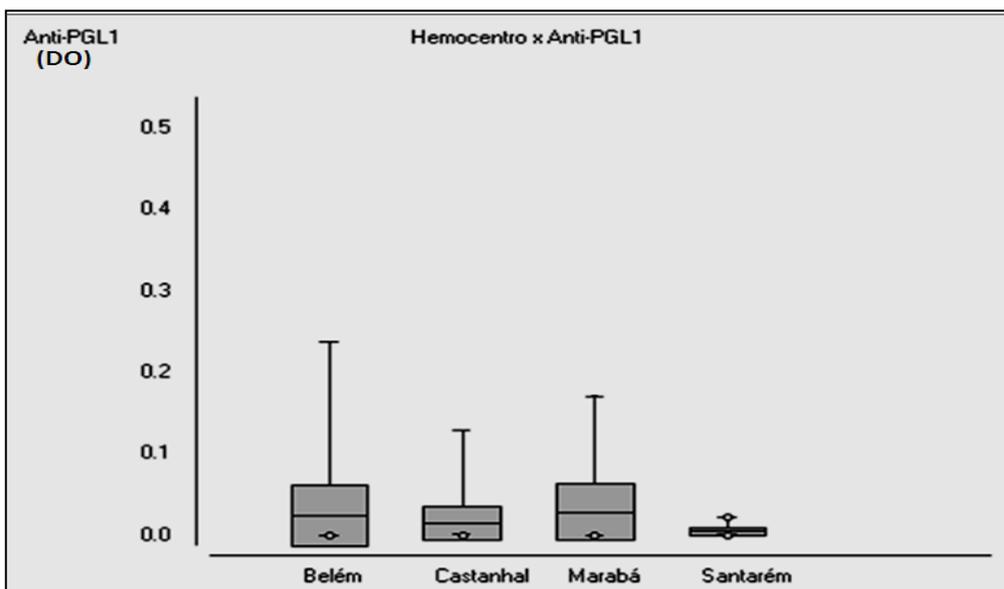
** três indivíduos não informaram escolaridade

5.1 ANÁLISE DAS MÉDIAS DOS NÍVEIS DE ANTI-PGL-1 RESULTANTES DAS AMOSTRAS DO ESTUDO

5.1.1 Média dos níveis de anti-PGL-1 por hemocentro e relações entre médias.

A média dos níveis de PGL1, por hemocentro, nas amostras estudadas, mostrou os seguintes valores: H. Belém - 0,0279; H. Castanhal - 0,0179; H. Marabá - 0,0363 e H. Santarém - 0,0124. As diferenças entre as médias encontradas por hemocentro, através do teste t, mostrou significância estatística entre H. Marabá e H. Santarém ($p=0,0009$), (Figura 11).

Figura 11 - Média dos níveis de anti-PGL-1 (ELISA), por hemocentros do Estado do Pará. 2009-2010.



Teste t ($p = 0,0009$).

5.1.2 Média dos níveis de anti-PGL-1 por municípios que compõe os hemocentros

A média dos níveis de PGL1, por municípios que compõe os hemocentros, nas amostras estudadas, mostrou Belém-0,0279; Santarém-0,0124; Castanhal-0,0157; Parauapebas-0,0286; Igarapé-Açú-0,0107; Santa Isabel- 0,0268 e Breu Branco-0,0881. A análise da relação dos níveis de Anti-PGL1 entre as médias encontradas, aplicando o teste t, apresentou significância estatística ($p < 0,0001$) entre Belém x Igarapé-Açú, Santarém x Breu Branco,

Castanhal x Breu Branco, Igarapé-Açu x Breu- Branco e Santa Isabel x Breu Branco (Tabela 2).

Tabela 2 - Média dos níveis de anti-PGL 1 (ELISA), por municípios que compõem os hemocentros do Estado do Pará, 2009-2010.

Anti - PGL – 1			
Município	nº	Média μ	Desvio Padrão DP
Belém	352	0,0279	0,0491
Santarém	137	0,0124	0,0559
Castanhal	79	0,0157	0,0249
Parauapebas	166	0,0286	0,0676
Igarapé- Açu	124	0,0107	0,0197
Santa Isabel	119	0,0268	0,0515
Breu Branco	24	0,0881	0,0731

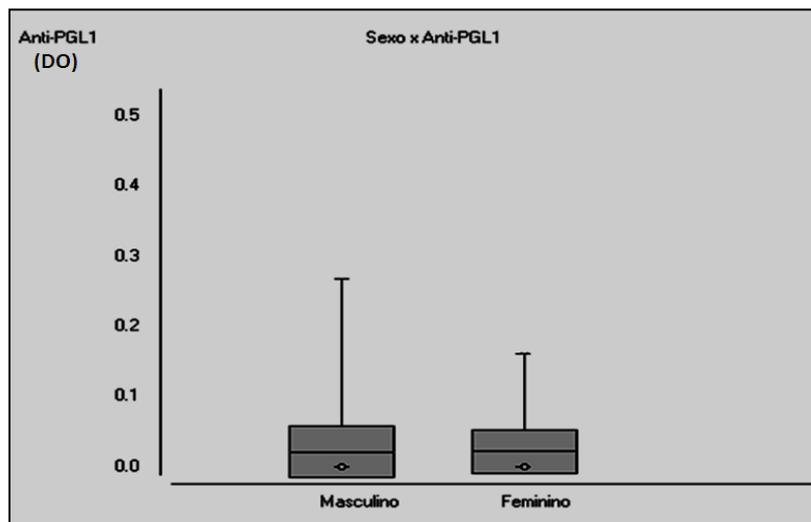
Teste t ($p < 0,0001$) Belém x Igarapé- Açu; Santarém x Breu-Branco; Castanhal x Breu Branco; Igarapé-Açu x Breu Branco; Santa Isabel x Breu Branco.

Fonte: Hemocentros do Estado do Pará.

5.1.3 Média dos níveis de anti-PGL-1 segundo variável independente sexo.

A análise da média aritmética dos níveis de anti-PGL1 entre os sexos, na amostra estudada, não demonstrou diferença estatística significativa ($p = 0,5068$), conforme apresentado no Box – Plot (Figura 12).

Figura 12 - Média dos níveis de anti-PGL1, segundo o sexo. Hemocentros- Pará. 2009-2010.

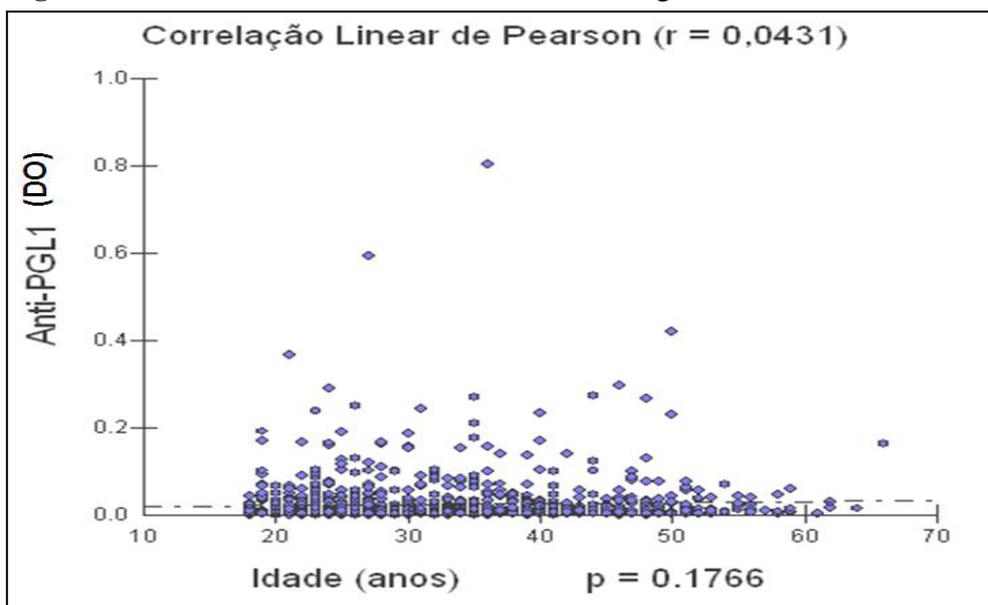


Teste t ($p = 0,5068$)

5.1.4 Níveis de anti-PGL-1 de acordo com a variável faixa etária

Através da correlação linear de Pearson não se verificou nenhuma tendência à redução ou ao aumento dos títulos de anti-PGL1 com o avançar da idade, sendo este achado estatisticamente não significativo ($p = 0,1716$). Observa-se também que o coeficiente de Pearson (r) é muito próximo do zero ($r = 0,0431$), atestando fraca associação entre as variáveis estudadas. Conclui-se, portanto, que não há relação significativa entre os níveis de anti-PGL1 e a idade neste estudo, ou seja, independente da idade que o paciente apresente, não se observou alterações significativas nos níveis de anticorpos anti-PGL1, conforme mostra o diagrama de dispersão abaixo (Figura 13).

Figura 13 - Níveis de anti-PGL-1 em doadores, segundo faixa etária.



5.1.5 Média dos níveis de anti-PGL-1 em presença de cicatriz da vacina BCG.

A grande maioria (88,1%) dos doadores de sangue, apresentou cicatriz de vacina BCG no braço D. A análise comparativa da descrição dos níveis de anti-PGL1 entre pacientes imunizados e não imunizados com BCG não mostrou significância estatística (teste t, $p = 0,2011$), obteve-se a média de $0,023 \pm 0,04$ entre os pacientes imunizados com BCG e de $0,0331 \pm 0,08$ entre os pacientes não-imunizados com BCG. (Tabela 3).

Tabela 3 - Níveis de anti-PGL1, segundo, presença de cicatriz de vacina BCG. Hemocentros - Pará, 2009-2010

PRESENÇA DE CICATRIZ BCG	n	%	Níveis de anti-PGL-1	
			Média μ	Desvio Padrão DP
Sim	876	88,1	0,023	0,0465
Não	118	11,9		0,0832
Total	994	100,0	0,033	

Teste t (p = 0,2011)

5.2 DISTRIBUIÇÃO DA SOROPOSITIVIDADE CONTRA ANTÍGENO PGL-1 NA AMOSTRAS DE DOADORES : PC \geq 0,2.

Conforme demonstrada abaixo, na Tabela 4, a soropositividade nas amostras dos doadores apresentou no hemocentro-Marabá seu maior percentual (2,1%), seguido pelo hemocentro-Belém (2,0%), o menor percentual correspondeu ao hemocentro-Castanhal (0,6%).

Tabela 4 - Taxas de soropositividade de anti-PGL-1(ELISA) nas amostras dos doadores. Hemocentros- Pará, 2009-2010.

Hemocentro	Anti-PGL1				Total	
	< 0,2		\geq 0,2		N	%
	n	%	n	%		
Belém	346	98,0	7	2,0	353	35,3
Castanhal	320	99,4	2	0,6	322	32,2
Marabá	185	97,9	4	2,1	189	18,9
Santarém	135	98,5	2	1,5	137	13,7
Total	986	98,5	15	1,5	1001	100,0

Teste G (p = 0,4059)

5.3 DISTRIBUIÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA DE ANTÍGENO ANTI-PGL-1 NAS AMOSTRAS DE DOADORES: $PC \geq 0,2$.

Na Tabela 5 os resultados mostraram que a maior soroprevalência ocorreu entre os doadores do hemocentro-Marabá (0.90 %), seguido do hemocentro-Santarém (0.44 %). A menor taxa de soroprevalência ficou com a população de doadores do hemocentro-Belém (0.13 %).

Tabela 5 - Distribuição da soroprevalência de IgM anti-PGL-1, segundo número de doadores soropositivos. 2009-2010.

Hemocentro	População		Anti -PGL1 $\geq 0,2$	
	N	n	%	
Belém	5216	7	0,13	
Castanhal	462	2	0,43	
Marabá	442	4	0,90	
Santarém	451	2	0,44	
Total	6571	15	0,23	

5.4 DEFINIÇÃO DE PONTOS DE CORTE (PC) PARA O TESTE ANTI-PGL-1 EM ÁREAS ENDÊMICAS DO ESTADO DO PARÁ.

Conforme já mencionado na metodologia, a obtenção do ponto de corte (PC) deste estudo seguiu os padrões adotados pela OMS, ou seja, a média dos níveis de anti-PGL-1 encontrados na população do estudo acrescido de duas vezes o valor do desvio padrão (média dos níveis ± 2 DP). Em virtude da análise das médias dos níveis de anti-PGL-1, entre alguns dos municípios deste estudo ter apresentado significância estatística ($p < 0,0001$) (tabela 2), optou-se por identificar PC com base na média geral dos níveis de anti-PGL-1 de todos os doadores, com base na média por hemocentro e com base na média por município para verificar a ocorrência de variações importantes.

Foi obtido o PC geral global de 0,13 (Quadro3), o mesmo valor foi encontrado para o hemocentro Belém e para o município de Belém. O PC com valor 0,12 foi comum para o hemocentro Santarém e para o município de Santarém. O hemocentro Marabá e o Castanhal

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

tiveram PC diferenciados, 0,18 e 0,09 respectivamente (Quadro4). Os municípios do estudo que compõe o hemocentro Marabá (Parauapebas e Breu Branco) também tiveram PC diferenciados que foram 0,16 e 0,23 respectivamente (Quadro5). Não houve significância estatística entre os PC dos hemocentros (teste t; $p= 0,5$) e nem entre os PC dos municípios (teste t; $p= 0,4512$).

Quadro 3 - Ponto de Corte Geral Global

	Média	Desvio Padrão	Ponto de Corte
Geral	0,0241	0,052	0,13

Quadro 4 - Ponto de Corte por Hemocentro

Anti - PGL 01				
Hemocentro	Média	Desvio Padrão	Ponto de Corte	Percentual de municípios endêmicos nos hemoc.
	μ	DP	$\mu + 2 \times DP$	%
Belém	0.03	0.05	0.13	67,0 (Muito alto)
Castanhal	0.02	0.04	0.09	36,0 (Hiperendêmico)
Marabá	0.04	0.07	0.18	92,0 (Hiperendêmico)
Santarém	0,01	0,06	0,12	44,0 (Hiperendêmico)

Teste t; $p= 0,5$

Quadro 5 - Ponto de Corte por Municípios

Anti - PGL 01				
Município	Média	Desvio Padrão	Ponto de Corte	Endemicidade
	μ	DP	$\mu + 2 \times DP$	taxas de detecção geral
Belém	0.03	0.05	0.13	32,02 (Muito alto)
Santarém	0.01	0.06	0.12	25,78 (Muito alto)
Castanhal	0.02	0.02	0.07	46,219 (Hiperendêmico)
Parauapebas	0.03	0.07	0.16	174,09 (Hiperendêmico)
Igarapé- Açu	0.01	0.02	0.05	39,73 (Muito alto)
Santa Izabel	0.03	0.05	0.13	31,94 (Muito alto)
Breu Branco	0.09	0.07	0.23	118,10 (Hiperendêmico)

Teste t; $p= 0,4512$

5.5 DISTRIBUIÇÃO DA SOROPOSITIVIDADE NAS AMOSTRAS DE DOADORES DE SANGUE, COM BASE EM PONTOS DE CORTE DISTINTOS: ≥ 0.20 e $\geq 0,13$

A análise da tabela abaixo demonstrou, em termos absolutos, que a soropositividade, observada nas variáveis sexo, idade, BCG, municípios e hemocentros, quando se usou ponto de corte com valor 0,13, passou de 15 para 36, porém o aumento não foi suficiente a ponto de produzir significância estatística.

Tabela 6 - Distribuição comparativa de soropositividade nas amostras de doadores de sangue com pontos de corte distintos. Pará, 2009-2010

Variáveis estudadas	Anti - PGL1 SOROPOSITIVIDADE				Teste estatístico	
	≥ 0.20		≥ 0.13			
	n	%	n	%		
Sexo						
Masculino	11	73.3	25	69.4	Teste G p = 0,9526	
Feminino	4	26.7	11	30.6		
Total	15	100.0	36	100.0		
Idade (anos)						
≤ 21	1	6.7	3	8.3	Teste G p = 0,7165	
22 a 45	10	66.7	27	75.0		
46 a 60	4	26.7	5	13.9		
> 60	0	0.0	1	2.8		
Total	15	100.0	36	100.0		
Hemocentro						
Belém	7	46.7	16	44.4	Teste G p = 0,9470	
Castanhal	2	13.3	6	16.7		
Marabá	4	26.7	11	30.6		
Santarém	2	13.3	3	8.3		
Total	15	100.0	36	100.0		
Municípios						
Belém	7	46.7	16	44.4	Teste G p = 0,5073	
Santarém	2	13.3	3	8.3		
Castanhal	0	0.0	2	5.6		
Igarapé-Açú	0	0,0	1	2.8		
Paraupébas	2	13.3	3	8.3		
Santa Izabel	2	13.3	3	8.3		
Breu Branco	2	13.3	8	22.2		
Total	15	100.0	36	100.0		
Vacina BCG						
Sim	13	86.7	30	83.3		Teste G p = 0,9016
Não	2	13.3	6	16.7		
Total	15	100.0	36	100.0		

6 DISCUSSÃO

A descoberta de casos de hanseníase é definida pelo exame clínico, o qual é soberano. Não existe exame laboratorial sensível que possa, isoladamente, diagnosticar a doença.

Com a descoberta do antígeno específico do *M. leprae* (PGL-1), a sorologia mostrou-se um recurso altamente sensível para detecção de anticorpos contra o *M. leprae* na corrente sanguínea. Muitos estudos demonstraram que a carga bacilar de um paciente de hanseníase tem correlação com a existência de anticorpos IgM direcionados contra o glicolípido fenólico (PGL-1). Portanto, a detecção de anticorpos contra o *M. Leprae* é potencialmente útil para estudos soropidemiológicos, uma vez que a prevalência da soropositividade em uma população pode significar o reflexo da taxa de exposição/infecção (MENZEL, 1987; SOEBONO, 1992; CHANTEAU, 1998; STEFANI, 1998).

A sorologia pelo método ELISA, requer a existência de um ponto de corte para separar doentes de não doentes. O ponto de corte geralmente é identificado a partir do soro de doadores de sangue, em virtude dos mesmos, passarem por triagem criteriosa antes da doação, diminuindo assim a possibilidade de reação cruzada no momento do teste sorológico. Pode também proceder de pessoas não doadoras consideradas sadias, sem sinais clínicos de hanseníase. No entanto, se faz necessário que os participantes do estudo não sejam contato domiciliar de portador de hanseníase e preferencialmente pertencentes à mesma comunidade (MENZEL, 1987; CELONA, 1993; CHANTEAU, 1998; BÜHRER-SÉKULA, 1998).

O presente estudo teve como amostra 1.001 doadores de sangue demandantes dos quatro hemocentros do Estado do Pará com objetivo de descrever o comportamento sorológico dos níveis de anticorpos anti-PGL-1, método ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará e sua correlação com níveis de endemicidade e fatores demográficos. Os hemocentros estão localizados em cidades pólos responsáveis pela captação de doadores, e, distribuição de sangue para as unidades hospitalares municipais e estaduais. O Estado do Pará possui hemorrede composta por quatro hemocentros, que são: Hemopa-Belém (coordena e gerencia as ações dos demais), Hemopa-Castanhal, Hemopa- Marabá e Hemopa-Santarém.

A análise dos resultados mostrou que as maiores demandas de doadores aconteceram nos hemocentros, das cidades pólos, que possuem maior população, destacando-se o Hemocentro–Belém com maior número de doadores, seguido, pelo Hemocentro- Castanhal.

Mais da metade da amostra dos doadores foi composta pelo sexo masculino, característica comum entre o perfil de doadores de sangue, de acordo com dados estatísticos do HEMOPA-PA, e reafirmada em vários trabalhos como os de Moura (2006) e Araújo (2010) que encontraram a mesma característica. Historicamente os homens sempre doaram mais sangue que as mulheres (BRASIL, 2004). Vale ressaltar, que por norma do Ministério da Saúde os homens podem doar sangue até quatro vezes ao ano, enquanto as mulheres podem doar até no máximo três vezes. Possivelmente esse fato contribui para a maior demanda masculina.

Com relação à idade dos doadores encontrada neste estudo, foi compatível com a de outros trabalhos, ou seja, os adultos jovens são os que mais doam sangue. A idade preconizada para doação era mínima de 18 anos e máxima de 60 anos. Em dezembro de 2002, foi alterada a máxima para 65 anos (BRASIL, 2004).

A escolaridade, neste estudo, apontou que as doações foram maiores entre as pessoas que tem o ensino médio. Araújo (2010) também encontrou o mesmo dado e comenta que a escolaridade possibilita maior entendimento da importância das doações para a sociedade. A escolaridade é um fator essencial também na prevenção de diversas doenças infecto-contagiosas como é o caso da hanseníase.

Em resumo o perfil da amostra teve como características ser composta predominantemente por jovens e adultos jovens do sexo masculino, sadios em virtude de serem doadores de sangue. Achado importante para a proposta deste trabalho, uma vez que o sexo e a idade são variáveis que podem interferir nos níveis séricos de IgM, que são anticorpos específicos anti-PGL-1. Esses anticorpos podem estar fisiologicamente mais elevados em organismos jovens de ambos os sexos e em mulheres até a idade adulta, conforme observado por Maddison et al., (1975), ou podem se encontrar elevados na resposta humoral em portadores de hanseníase (HUNTER et al., 1982; VAN BEERS, 1994).

O Estado do Pará, até novembro de 2010, era dividido em seis Meso Regiões de Saúde, em quatro delas, Sul, Sudeste, Nordeste e Baixo Amazonas, as taxas de detecção de hanseníase são de hiperendemicidade ($\geq 40.0/100.000$ hab.). Nas duas restantes, Região Metropolitana e Marajó, as taxas são de muito alta endemicidade ($20-39.99/100.000$ hab.). O grande território do Pará possui características propícias para que essas taxas se mantenham elevadas, como clima úmido e temperatura elevada (SILVA, 2010). Somado a esses fatores algumas áreas do Estado do Pará fazem parte de clusters que foram evidenciados por Penna et al. (2008), e o Estado possui taxas elevadas de detecção em menores de 15 anos, o que piora o quadro epidemiológico (BRASIL, 2011).

Nos anos de 2009 a 2011 foram notificados 2.148 casos nas formas multibacilares entre os municípios que fizeram parte deste estudo (SINAN, 2011), e as formas multibacilares apresentam predomínio de resposta imunológica do tipo humoral, em geral, com níveis elevados de anticorpos anti-PGL-1 (HUNTER et al., 1982).

A análise dos níveis de anti-PGL-1 nas amostras de sangue, dos doadores deste estudo, identificou que quase a totalidade (98.5%), apresentou individualmente níveis de anti-PGL-1 acentuadamente inferior a 0.2, e **média geral de 0,0241**, portanto, bem aquém do ponto de corte que em geral é usado nos protocolos de sorologia (ELISA), no Estado do Pará. Em virtude das elevadas taxas de endemicidade em hanseníase, do ambiente sócio-econômico, geográfico, climático e também pela presença de clusters, supor-se-ia encontrar negatividade sorológica mais próxima do limite do ponto corte, usado na região (0,2).

Este achado é concordante, em termos percentuais, com estudo realizado em área endêmica, nas Filipinas, por Cellona (1993), ao analisar 401 indivíduos sadios da população geral, encontrou 98.3% de soronegativos, adotando ponto de corte menor que 0.16 (< 0.16).

Outros estudos realizados em áreas de grande endemicidade também detectaram, na população geral, baixos níveis de anticorpos anti-PGL-1, Brett et al. (1983), Bühner (1998) e Mitie (2003), mas, também demonstraram que uma parcela dos casos novos de hanseníase surgiram de soronegativos da população geral de área endêmica, sem contato prévio conhecido. O que reforça a idéia de alguns pesquisadores que nem toda infecção subclínica, pelo *M. leprae*, é detectável pela sorologia, visto que a mesma revela elevadas especificidade

e sensibilidade nos casos em que predomina a resposta imunológica do tipo humoral, e baixa sensibilidade nos casos onde predomina a resposta imunológica celular. Dessa forma, as possíveis infecções sub-clínicas em organismos onde a resposta celular é dominante poderiam não ser detectadas pela sorologia (KLATSER, 1996; BÜHRER, 1998; VAN BEERS et al., 1999).

Por sua vez, a análise da **média** dos níveis de anti-PGL-1, **por hemocentro**, refletiu os achados individuais de soronegatividade, com significância estatística entre os níveis dos hemocentros de Marabá e de Santarém. O hemocentro Marabá é formado por municípios que ficam localizados no Sul e Sudeste do Estado do Pará, onde a grande maioria é classificada, segundo a OMS, como hiperendêmico para hanseníase. O hemocentro de Santarém é composto por municípios localizados na região do Baixo Amazonas, onde um pouco menos da metade (44%) dos municípios possuem taxas de detecção dentro dos índices de hiperendemicidade, a outra metade possui taxas de alta (24%) e muito alta endemicidade (20%). Essas variações nas taxas de endemicidade podem ter influenciado nos resultados encontrados, fazendo com que a média dos níveis de anti-PGL-1, em Santarém alcançasse 0.0124, portanto, inferior a de Marabá que alcançou 0.0364.

Os municípios onde a soronegatividade anti-PGL-1 se apresentou menos distante do limiar do ponto de corte, foram os que evidenciaram as taxas mais elevadas de detecção geral em hanseníase (PCH/SINAN, 2010) como Breu Branco (118,10/100.000 hab.), que pertence a hemorrede de Marabá, e o município de Castanhal que pertence a hemorrede Castanhal (46,21/100.000 hab.) ambos hiperendêmicos, cujas soronegatividades foram 0,091 e 0,016 respectivamente. A expectativa seria encontrar uma negatividade mais próxima do limiar do ponto de corte, em consequência das elevadas taxas de detecção e das características epidemiológicas da região favoráveis a infecção pelo bacilo de Hansen como clima, densidade populacional e condições sócio-econômicas, fatores estes já destacados em trabalhos anteriores como em Chanteau et al. (1987); Fine e Ponniguhase (1988); Büheler, (2003); Dias Nobre, (2005) e Montenegro (2004) também, pela provável elevada carga bacilar circulante no meio ambiente, em virtude do número de casos multibacilares notificados nessas áreas, e pela presença de clusters identificados no Sul, Sudeste e Nordeste paraense, segundo Penna et al. (2008).

Silva (2008) ao realizar análise sorológica em controles de área endêmica no Brasil (n=72) e em controles no Chile, país não endêmico, (n=30), encontrou como médias sorológicas de anti-PGL-1, valores de 0.041 e 0.026 respectivamente. Observou-se, portanto, que os valores da média dos níveis de anti-PGL-1 da área de um país não endêmico, encontrada no estudo citado, foi próxima a encontrada neste estudo, área de hiperendemicidade, cujo valor alcançou 0.0241.

Uma provável explicação para os resultados sorológicos encontrados neste estudo seria uma tendência imunológica à resposta celular, por parte do organismo dos indivíduos residentes nessas áreas, ocasionadas por características próprias do organismo, por fator imunogenético, ou por estímulo da imunoprofilaxia com BCG, conforme observado em estudos prévios realizados por Menzel (1997), Cellona (1993), Calado (2005), Amador (2004) no sudeste paraense em área hiperendêmica do nordeste do Pará e também Düpre et al. (2012).

Com relação às variáveis idade e sexo, observou-se predominância de jovens (87.1%), e maior proporção de homens (69.7%), não foi observada nenhuma tendência significativa a aumento ou redução nos níveis de anti-PGL-1 em relação a essas variáveis. Resultado concordante com o observado por Calado (2005) e discordante com pesquisas que afirmam que mulheres jovens e crianças, de ambos os sexos, têm como característica natural do sistema imunológico, tendência em produzir maior quantidade de IgM segundo Menzel (1975), que se traduziria em exame sorológico ELISA positivo, sem necessariamente estar associado a infecção sub-clínica pelo *M. leprae* conforme Mitie et al. (1998); Goulart et al. (2002) e, um declínio com o passar da idade (MENZEL, 1987; VAN BEERS, 1994; WU, 2002).

Outros estudos encontraram níveis mais elevados de anticorpos anti-PGL-1, em crianças, adolescentes, adultos jovens e mulheres como Bakker et al. (2004), Andrade et al (2008). A justificativa para o achado, segundo os pesquisadores, poderia ser devido a proporção de indivíduos dessas faixas etárias e do sexo feminino presentes na amostra, devido a metodologia do estudo. Barreto et al. (2010) em área endêmica no nordeste paraense, observaram níveis elevados de anti-PGL-1 em escolares, resultado atribuído, pelos autores, ao grau de hiperendemicidade da área do estudo.

Fine et al. (1988) também encontraram soropositividade maior entre mulheres e questionaram se esse achado era devido a uma maior exposição feminina ou ao fato das taxas IgM serem fisiologicamente maiores nas mulheres. Essa pesquisadora afirma que, a relação entre idade e soropositividade é importante, mas, existem fatores paralelos que devem ser levados em conta para avaliar essa relação, tais como: tempo de residência na área endêmica e procedência da pessoa, entre outras.

A presença de cicatriz da vacina BCG, observada nos doadores que fizeram parte do estudo, é um dado epidemiológico importante para hanseníase, uma vez que esta vacina foi incluída como medida de controle da doença, pelo Ministério Saúde através da portaria 125/SVS-SAS de 26 de março de 2009, para uso em contatos de portadores das diversas formas de hanseníase em duas doses. A vacina BCG faz parte do calendário da imunização básica de crianças recém-nascidas para proteção contra as diversas formas de tuberculose. É uma das mais antigas vacinas, foi produzida entre os anos de 1906 e 1919, a partir de cepa atenuada do *M. bovis* (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010).

Ressalta-se que o Brasil é o único país endêmico que adota a dose de reforço da vacina BCG como suporte para o sistema imunológico na luta contra a hanseníase, conduta adotada possivelmente pela baixa cobertura dos exames de contato (OLIVEIRA, 2008).

Na amostra estudada, a grande maioria dos doadores (88,1%) possuía uma cicatriz de vacina BCG, no braço D, comprovando o uso do esquema básico na infância. Apenas 11,1% não possuía cicatriz, no entanto, não houve diferença significativa nos resultados dos níveis de PGL-1, pois ambos os grupos de vacinados e não vacinados apresentaram médias dos níveis de PGL-1 de 0.023 e 0.0331 respectivamente. Os resultados levam a supor que, nos portadores de cicatriz, a vacina poderia ter contribuído para uma ação mais eficaz do sistema imunológico pelo provável estímulo à resposta celular, tornando-a mais competente no combate ao bacilo, mesmo em uma dose, refletindo dessa maneira, níveis séricos baixos de anticorpos anti-PGL-1.

Estudos destinados a avaliar o efeito da vacina BCG, em contatos, identificaram redução no número de casos multibacilares entre eles, e concluíram que seria pelo estímulo da resposta celular induzida pela vacina (DUPPRE, 1998; LOMBARDI et al., 1995; BAKKER,

2005). Rodrigues et al. (1992) em estudo realizado em área de alta endemicidade no Brasil, observou 81% de efeito protetor da vacina BCG em contatos e também chegou à mesma conclusão.

Amador (2004) ao analisar a eficácia da vacina BCG, em contatos de portadores de hanseníase, em áreas endêmicas do Sudeste do Estado do Pará, observou declínio significativo de soropositividade anti-PGL-1 após introdução da segunda dose da vacina. A proporção de soropositivos em 1998 era de 82.52% e caiu para 17.47% em 2002. Esse achado reforça a teoria de que a vacina teria impacto na incidência das formas contagiantes doença, segundo a autora.

Düpre et al. (2012), em estudo de coort em área endêmica do Brasil, observaram que os contatos soropositivos de portador de hanseníase vacinados com BCG, ao desenvolverem hanseníase, foram acometidos pela forma paucibacilar. Os contatos soronegativos não vacinados foram acometidos das formas multibacilares. Achado que foi atribuído, pelos pesquisadores, ao estímulo de TNF- γ com conseqüente estímulo da resposta celular.

Barreto et al. (2010) em estudo com escolares da população geral de um município de área hiperendêmica da região nordeste do Pará, observaram que houve associação significativa entre soropositivos e o status da vacina com BCG. Os pesquisadores argumentaram que esse achado seria devido a uma co-ocorrência da infecção pelo *M.leprae* e a vacina BCG induzindo a formação de elevados níveis de anti-PGL-1, e que posteriormente poderia haver reversão para resposta celular.

No presente estudo, os doadores que não apresentaram cicatriz de vacina BCG e, portanto, não foram considerados vacinados, podem ter como justificativa para os níveis considerados baixos de anti-PGL-1 a influência da carga genética nas defesas naturais, ou seja, já trazem o perfil de resposta imunológica do tipo celular. Fato já discutido em alguns trabalhos como os de Foss (1997), Calado (2005) e Van Brakel (2000), entre outros.

Estudos realizados no Chile Continental reafirmaram a não existência de casos de hanseníase nas populações dessa área, fato que foi atribuído a fatores como: clima, topografia, a genética e ao desenvolvimento de programas de vacinação com BCG (SILVA, 2008).

A análise da soropositividade na população estudada mostrou percentuais que podem ser considerados baixos, em virtude, das elevadas taxas de detecção de hanseníase nessas áreas. Somados os quatro hemocentros alcançaram um percentual de 1,5%. (15/1001).

Resultados semelhantes foram relatados por Amador (2004) em estudo realizado em contatos de portadores de hanseníase em municípios hiperendêmicos do Sudeste paraense. A expectativa da referida pesquisa seria encontrar taxas elevadas de soropositividade, uma vez, que uma grande parte dos casos índices levantados no estudo, segundo a autora, era de formas multibacilares. As baixas taxas de soropositividade foram atribuídas a uma fraca resposta humoral e forte resposta celular, não detectável pela sorologia. Os ensaios sorológicos não refletem todos os casos clínicos, principalmente onde predomina resposta imunológica celular (KLATSER, 1996; BÜHRER, 1998; VAN BEERS, 1999).

Por outro lado, estudo realizado no Nordeste paraense, em escolares da população geral, não contatos de casos de hanseníase encontrou taxas elevadas de soropositividade (BARRETO et al., 2010). Achado justificado pelos autores, aos elevados índices de endemicidade dessa área, como também nas diferenças de protocolos da técnica ELISA que trazem alterações nas diluições do antígeno e no tipo de antígeno (CHO et al., 2001; SCHURING et al., 2006). Poderia-se também aventar a possibilidade da característica fisiológica que possui essa faixa etária em relação aos níveis mais elevados de anticorpos ter contribuído para o achado (MENZEL et al., 1975; WU, 2002; GOULART et al., 2002).

Salgado et al. (2012) analisando níveis de soropositividade entre contatos e não contatos de portador de hanseníase, e escolares da população geral de um município do oeste do Pará, onde a endemicidade é alta, encontrou percentuais de soropositividade elevados em todos os grupos. A positividade encontrada nos escolares levou os pesquisadores supor que existe uma elevada prevalência de infecção subclínica pelo *M. Leprae* entre eles, e que a origem do contato estaria em caso-índice não identificado no domicílio dos escolares.

Outros estudos, realizados na Indonésia e Nova Guiné encontraram taxas de soropositividade em área de elevada endemicidade que variou entre 9% e 32% (SOEBONO et al., 1991; BAUGAMART et al., 1987). Essas variações foram atribuídas a vários fatores, inclusive o uso de diferentes antígenos, diferenças de sensibilidade e especificidade e

diferentes pontos de corte. Proporção considerável de soropositividade também foi relatada por Bühner (2003) com percentuais entre 17.9% e 12% na população geral em área endêmica no Brasil.

Alguns pesquisadores, como Gonzalez-Abreu et al. (1990); Van Beers, Madeleine, Klatser, (1996) consideram a população geral de área hiperendêmica de hanseníase como contato social, pois estimam que o bacilo esteja circulando, principalmente se a maioria dos casos diagnosticados nessa população for das formas multibacilares. No Estado do Pará uma grande parcela dos casos diagnosticados são multibacilares, conforme dados do SINAN (2010).

Saad, Medeiros e Gallo (1991), Foss, Callera e Alberto (1993) realizando testes sorológicos em grupo controle (doadores de sangue) em áreas endêmicas, no Sudeste brasileiro, utilizando antígenos distintos e técnica ELISA com sutis modificações, em população brasileira com endemicidade elevada, encontraram 7% e 3% de positividade respectivamente. Ao analisar esses resultados, observaram que os indivíduos positivos, não apresentavam sinais clínicos de hanseníase. Os autores concluíram que esses dados poderiam revelar uma possível infecção subclínica, ou uma reação cruzada com micobactéria desconhecida.

Pesquisadores em hanseníase acreditam que nem toda infecção subclínica seja detectável pelos níveis de anti-PGL-1, principalmente, nos casos em que o organismo tem preponderante resposta celular entre esses estão, Menzel (1987), Gonzalez-Abreu et al. (1990), Beers, Madeleine e Klatser (1996). Essa suposição pode ser estendida à situação epidemiológica das áreas deste estudo.

Seguindo o raciocínio de que a população geral de área hiperendêmica para hanseníase pode ser considerada contato social, pode-se dizer que, existe risco significativo de exposição e/ou infecção pelo *M. leprae* nos indivíduos residentes nessas áreas, conforme já mencionado por estudos (VAN BEERS; HATA; KLATSER, 1999). Entretanto a soropositividade encontrada neste estudo não foi compatível com a provável exposição ao bacilo. Diante disso, poderia supor que a aparente escassez de soropositivos, deste estudo, se deve a fatores imunogenéticos, somados à intervenção vacinal com BCG (mesmo que em uma

dose), como também aventar hipótese que o uso de um ponto de corte mais baixo, resultaria em soropositividade maior e mais compatível com a realidade endêmica da região.

A soroprevalência deste estudo, a qual representa o número de soropositivos pela população de doadores, mostrou números relativos compatíveis aos resultados encontrados para soropositividade. A maior soroprevalência ocorreu entre os doadores do hemocentro-Marabá (0.90%) seguido do hemocentro-Santarém (0.44 %), a menor taxa de soroprevalência ficou com a população de doadores do hemocentro-Belém (0.13%).

Estes achados se contrapõe aos achados de soroprevalência de trabalhos clássicos como os de Chanteau et al., (1987) em controles de área endêmica da Polynésia Francesa e Cho e Kim, (1992) em área endêmica das Phillipinas. Na literatura de modo geral a prevalência de anticorpos anti-PGL-1 varia entre 1.0 a 16.0% entre controles de áreas endêmicas e entre contatos domiciliares a taxa eleva para uma variação de 12 a 20% (CHO; KIM, 1992; CHANTEAU et al., 1987).

Portanto, as taxas de soroprevalência encontradas neste estudo não refletiram a dimensão das taxas de detecção de hanseníase nessas áreas hiperendêmicas.

Os estudos soropidemiológicos, pelo método quantitativo ELISA, necessitam de parâmetro que estabeleça uma divisão entre resultados positivo e negativo ou limiar de reatividade ou ponto de corte, o qual é obtido com base em população sadia não contato de hanseníase.

Chanteau et al. (1987); Menzel, et al. (1987) chegaram a conclusão que o melhor ponto de corte é obtido da população onde será realizado o estudo, e, que os participantes não devem ser contato intradomiciliar, independente do grau de endemicidade, para evitar desvios para mais ou para menos e conseqüentes falso-positivos ou falso-negativos. Critério esse, que foi atendido neste estudo.

Existem duas metodologias básicas de se obter um ponto de corte para o teste anti-PGL-1 na hanseníase pelo método ELISA. A primeira é denominada curva ROC (Receiver Operating Characteristic), tem larga aplicação na medicina diagnóstica, trabalha com dois

grupos (doentes e não doentes) avalia sensibilidade e especificidade (PAGANO et al., 1993; MARTINEZ et al., 2003; SILVA, 2005). A segunda metodologia é a mais usada e recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), trabalha com a média dos valores detectados mais dois ou três desvios padrão (média + 2 ou 3 SD).

Bürher (1998) obteve resultado em estudo realizado nas Filipinas. A população controle dessa pesquisa foi composta de pessoas que viviam na mesma comunidade que os portadores de hanseníase. A exigência do protocolo da pesquisa era que os controles não residissem com portador de hanseníase e nem tivessem sinais clínicos da doença. Os soros foram testados em duplicata, e, os resultados ELISA foram expressos pela média das absorbâncias das duplicatas. O valor final da densidade ótica (OD), de cada amostra de soro, foi calculado subtraindo o valor OD dos poços revestidos com BSA a partir do valor OD dos poços revestidos com DBSA. O ponto de corte foi obtido pela média dos resultados mais dois desvios padrão, resultando em uma OD de 0.200. Sendo então estipulado que valores iguais ou maiores que 0.2 seriam considerados positivos e abaixo de 0.2 negativos. Esse valor de ponto de corte é um dos mais utilizados em estudos soropidemiológicos a nível nacional.

Neste estudo, os procedimentos laboratoriais foram os mesmos adotados por Bürher (1998), uma vez que o objetivo desta pesquisa foi avaliar se existia diferença entre o ponto de corte identificado pela sua pesquisa, em relação ao ponto de corte encontrado por este estudo. Os soros também foram testados em duplicata, técnica já descrita na metodologia do trabalho. Os resultados obedeceram ao cálculo da média das absorbâncias das duplicatas mais dois desvios padrão, conforme orientação do Ministério da Saúde e usado por Bürher (1998).

O ponto de corte geral encontrado com base na média de todas as amostras dos doadores do estudo, foi **0.13**, ou seja, diferente ao de Bürher (1998), portanto, a hipótese formulada para este trabalho foi confirmada e demonstra comportamento sorológico diferenciado, o qual expressa o status imunológico da população não doente residente nessas áreas de elevada endemicidade, a qual pode ser considerada contato social (VAN BEERS; HATA; KLATSER, 1999). Resultados sorológicos anti-PGL-1, utilizando ponto de corte relativamente alto, (0.2) e altos (0.3 e até 0.4) com certeza possibilitam maior especificidade, ou seja, tem poucas possibilidades de fornecer resultados falso-positivos e tendem identificar pessoas que se vierem a desenvolver a doença hanseníase, será nas formas multibacilares,

onde predomina a resposta humoral com presença do anticorpo IgM, conforme observado por Cho et al., (1983), Brett et al., (1986), Burgess et al., (1986) e Mitie (1995) entre outros. Regra que nem sempre pode ser aplicada a todas as populações residentes em áreas endêmicas, pois os comportamentos sorológicos são diferenciados.

Corroboram com o achado deste estudo, pesquisadores como Saad et al. (1990), Foss et al. (1993) ao defenderem a ideia que um ponto de corte baixo, possibilita não só obter maior número de soropositivos como também identificar casos de infecção sub-clínica com potencial para prováveis casos multibacilares e paucibacilares. Esses autores argumentam dentro dessa visão, maior possibilita de vigilância e controle da doença, uma vez que o número de indivíduos a ser investigado passa a ser maior, o que é muito importante em área endêmica.

Cellona et al. (1993) ao analisarem soropositividade na população geral de área endêmica nas Filipinas, observaram que ao usar ponto de corte de 0.16 encontraram soropositivos em maior quantidade (1.5%) do que ao usar ponto de corte de 0.3 onde encontraram 0.2%.

Fine et al., (1988) ao avaliarem níveis de anticorpos anti-PGL-1 em área endêmica da Malazia, utilizaram diferentes pontos de corte (0.1 e 0.2), na expectativa de identificar taxas de 25 % a 5% de soropositivos com características de paucibacilares, na população geral.

Silva (2008), ao realizar estudo soroepidemiológico em área endêmica no Brasil (Minas Gerais), analisou 60 portadores de hanseníase e 70 controles, com pontos de corte diferenciados. Observou que ao utilizar ponto de corte baixo (0.15) em área endêmica obteve soropositividade maior do que quando usou ponto de corte mais alto (0.25). A pesquisadora ponderou que ao usar um ponto de corte baixo um número pequeno de pacientes multibacilares deixaria de ser identificado, ou seja, poucos falso-negativos, ao passo que uma maior proporção de pacientes paucibacilares seria classificada como multibacilar (falso-positivo).

Segundo Mitie (1995) e Cellona et al. (1993) o uso de pontos de corte baixos, não prejudica a especificidade do teste, no entanto, melhora a sensibilidade e possibilita a

descoberta de maior número de soropositivos, ou seja de prováveis infectados (infecção sub-clínica) e a partir daí fazer seguimento dos mesmos, favorecendo o diagnóstico da doença em pólo ainda não transmissível, contribuindo para interromper, desse modo, a transmissão da hanseníase e até de casos paucibacilares. Indivíduos sadios expostos de alguma forma ao *M.leprae*, principalmente residentes em áreas de grande endemicidade e com soropositividade para anti- PGL-1, pode-se inferir que estejam infectados (MENZEL et al., 1987).

Além da obtenção de um ponto de corte com base na média dos níveis de anti-PGL-1 do total das amostras, que foi denominado de PC geral (0,13), e já discutido anteriormente, optou-se também pela identificação de ponto de cortes com base na média dos níveis de anti-PGL-1 de cada hemocentro e com base na média dos níveis de cada município que fazem parte dos hemocentros estudados.

Ao analisar-se o comportamento dos pontos de corte de cada hemocentro observou-se que o hemocentro Castanhal apresentou menor PC (0,09). Pertence a esse hemocentro a mesorregião nordeste do Pará, onde 36,0 % dos municípios têm parâmetro de hiperendemicidade em hanseníase e 27,0% de muito alto endemicidade. O maior PC (0,18) pertenceu ao hemocentro Marabá, cujas mesorregiões sudeste e sudoeste do Pará possuem municípios com os maiores percentuais de endemicidade em hanseníase, 92,0% e 94,0% respectivamente. Portanto, observou-se que a mesorregião que teve maior proporção de municípios hiperendêmicos também teve o maior PC e a que apresentou menor proporção apresentou o menor PC. Pode-se então dizer que os valores dos pontos de corte, obtidos através das médias dos níveis de anti-PGL-1 dos hemocentros deste estudo, apresentaram-se relacionados ao grau de endemicidade das mesorregiões, mas os níveis de anticorpos não refletiram a magnitude da hanseníase nessas áreas, segundo os parâmetros estabelecidos pelo MS.

A análise dos pontos de corte por município mostrou que, dos quatro municípios com parâmetro de **muito alta endemicidade**, três apresentaram PC relacionados com essa graduação, como Belém (0,13), Santarém (0,12) e Santa Izabel (0,13), portanto, compatíveis com as proporções das taxas de detecção. Somente o município de Igarapé-Açu apresentou PC muito baixo (0,05) provavelmente em consequência do tamanho da amostra e dos baixos níveis sorológicos de anti-PGL-1. Os municípios **hiperendêmicos** apresentaram PC com

valores mais elevados, Parauapebas obteve PC= 0,16, e Breu Branco obteve o maior PC (0,23), excessão de Castanhal que apresentou PC de 0,07. Portanto, os valores encontrados mantém relativa relação com os níveis de endemicidade desses municípios, mas como já comentado anteriormente os níveis de anti-PGL-1 são notadamente baixos, mais compatíveis com áreas de baixa endemicidade.

Os comportamentos sorológicos anti-PGL-1, encontrados neste estudo reforçam a recomendação que foi colocada por pesquisadores, no início das pesquisas sorológicas com anticorpos IgM, anti-PGL-1 pelo método ELISA, na década de 80 (MENZEL et al, 1987), a qual recomendava que o PC para sorologia deveria ser obtido de indivíduos saudáveis, não contato intradomiciliar de portador de hanseníase, residentes na área endêmica onde seria realizado o estudo, possibilitando dessa maneira a comparabilidade entre os níveis sorológicos de contatos e não contatos, assim como entre doentes e não doentes, dessa maneira as avaliações sorológicas e os estudos soropidemiológicos teriam resultados mais precisos.

Convém reafirmar que as mesorregiões e os municípios de onde foram retiradas as amostras de sangue para o estudo, são áreas de hiperendemicidade e de muito alta endemicidade, portanto a população geral dessas áreas pode ser considerada como contato social, em virtude da provável existência de elevada carga bacilar no meio ambiente. Dessa maneira, supor-se-ia que a soronegatividade a ser encontrada, não seria tão inferior ao ponto de corte utilizado, e previamente estabelecido (0,2). No entanto, o comportamento sorológico mostrou níveis de anti-PGL-1 mais compatíveis com áreas de baixa endemicidade. Resultados que podem ser interpretados de duas maneiras: ou os indivíduos do estudo não se infectaram pelo *M.leprae*, ou então ao se infectaram houve predomínio da resposta imunológica do tipo celular, e conseqüentemente níveis de anti-PGL-1 muito baixos.

Foi observado por Fine et al. (1989) que em teoria, altos títulos de anticorpos específicos, se interpretados como forte resposta humoral, podem refletir tanto infecção pelo *M. leprae* como o desenvolvimento de doença multibacilar. Teoria essa que os dados deste estudo contrapõem em virtude dos baixos títulos de anticorpos e do elevado número de casos multibacilares nas áreas do estudo. Os níveis sorológicos aqui descritos permitem supor que a utilização de PCs mais altos não é tão adequada para o perfil encontrado, pois tem alta especificidade e baixa sensibilidade. Por outro lado, PCs mais baixos são mais compatíveis,

pois aumentam a sensibilidade sem comprometer a especificidade segundo Cellona et al. (1993) e Mitie (1995), possibilitando a descoberta de maior número de infecção sub-clínica.

A análise do comportamento sorológico dos níveis de anticorpos IgM, anti-PGL-1, em relação às variáveis sexo, idade, vacina BCG, hemocentros e municípios, usando PC $\geq 0,13$, mostrou aumento da soropositividade em termos de valores absolutos: dobrou de 15 para 36. O aumento na soropositividade, apesar de não ter produzido resultados com significância estatística, é um achado interessante, na medida em que possibilita que maior número de indivíduos seja acompanhado, no intuito de diminuir a ocorrência de diagnósticos tardios e prevenir o aparecimento de incapacidades físicas, conforme discutido por Foss, et al. (1993); Cellona, et al. (1993) e Mitie (1995).

7 CONCLUSÕES

De acordo os objetivos propostos para este estudo, podemos concluir que:

- O comportamento sorológico observado neste estudo não foi compatível aos elevados parâmetros de endemicidade, apesar da provável carga bacilar existente no meio ambiente, portanto, os níveis de anticorpos não refletiram a magnitude da endemicidade da hanseníase nessas áreas;
- As médias dos níveis sorológicos de anti-PGL-1 na população estudada foram notadamente inferiores ao limiar de reatividade ou $PC \geq 0,2$, utilizado em estudos nacionais, sugerindo que tal PC pode não ser adequado à população estudada.
- Em consequência do comportamento sorológico encontrado, as variáveis, sexo e idade não mostraram associação significativa em relação aos níveis de anti-PGL-1 deste estudo;
- Considerando que neste estudo foi observado maior prevalência de indivíduos vacinados, supõe-se que a vacina pode ter influenciado no comportamento dos níveis de resposta humoral ao PGL-1, mesmo em uma dose;
- A soropositividade obtida com $PC \geq 0,2$ nos quatro hemocentros (Belém, Castanhal, Marabá e Santarém) foi baixa, se considerarmos as elevadas taxas de detecção dos municípios e a gradação de hiperendemicidade e muito alta endemicidade das mesorregiões do estudo;
- As taxas de soroprevalência encontradas não refletiram a realidade endêmica de hanseníase das mesorregiões e dos municípios do estudo e as elevadas taxas de detecção;

- O ponto de corte geral global (0.13) obtido neste estudo, mostrou maior compatibilidade com o comportamento sorológico dos níveis de anti-PGL-1 nas amostras do estudo e consequente aumento da soropositividade.
- A soropositividade obtida com $PC \geq 0,13$ dobrou em valores absolutos de 15 para 36 em todas as três variáveis analisadas, apesar de não ter produzido resultados com diferença significativa;
- Os pontos de corte obtidos com base na média dos níveis de anti- PGL-1 por hemocentro e com base na média por municípios mostraram variações relacionadas aos níveis de endemicidade e as taxas de detecção, mas não apresentaram diferenças significantes entre eles;
- Sugere-se a realização de outros desenhos de estudos soroepidemiológicos utilizando ponto de corte mais baixo, como o encontrado neste estudo (0.13), para avaliar a influencia do mesmo na sensibilidade do teste, na soropositividade entre contatos e não contatos de portadores de hanseníase, assim como na descoberta de infecção subclínica e seguimentos dos casos.

REFERÊNCIAS

ABE, M.; IZUMI, S.; SAITO, T.; MATHEU, S. K. Early diagnosis of leprosy by indirect immunofluorescence. **Lepr. India**, v. 48, n. 3, p. 272-6, 1976.

ABE, M.; MINAGAWA, F.; YOSHINO, Y.; OZAWA, T.; SAIKAWA, K.; SAITO, T. Fluorescent Leprosy antibody absorption (FLA- ABS) test for detecting subclinical infection with *M. Leprae*. **Int. J. lepr. Other Micobact. Dis.**, v. 48, n.2, p. 109-19, 1980.

ABEL, L.; CUA, V.V.; OBERT, J.; LAP. V.D.; DUE, L.K.; GROSSET, J.; LAGRANGE, P.H., 1990. Leprosy and BCG in southern Vietnam (letter). **Lancet**, 1: 1536.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AGUADO, S. G.; MALIK, A.; TOUGNE, C.; LAMBERT, P. H.; ENGERS, H D. Simplification and standartization of serodiagnostic test for leprosy based on phenolic glycolipid-1 (PGL-1) antigen. **Lepr. Rev.**, v. 57, Supl 2, p. 83-93, 1986.

AMADOR, M.P.S. **Soroprevalência para hanseníase em áreas endêmicas do Estado Pará**. Belém, 2004. Dissertação (Mestrado) –Núcleo de Medicina Tropical- NMT, Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.

ANANIAS, M. T. P. **Hanseníase**: estudo da reação tipo I do anti-PGL-1 nos pacientes do ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 1998, 199 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1998.

ANANIAS, M. T. P.; ARAÚJO, M.G.; GONTIJO, E. D.; GUEDES, A. C. M. Estudo do anti-PGL-1 em pacientes hansenianos utilizando a técnica de ultramicroelisa. **Anais Bras. Dermatol.**, v.77, n.4, jul./ago. 2002.

ANDRADE, V. Implementação da PQT/OMS no Brasil. **Hansen. Internationalis.**, v.31, n.1, p.37-60, 2006.

ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, supl.3, p. 90-102, 2003.

ARBELÁEZ, M.P ; NELSON, K.E ; MUNÓZ, A. BCG vaccine effectiveness in preventing tuberculosis and its interaction with human immunodeficiency virus infection. **Int J Epidem.**, 2000 ; 29 :1085-91.

BACH, M. A.; WALLACH, D.; FLAGEUL, B.; HOFFENBACH, A.; COTTENOT, F. Antibodies to Phenolic Glycolipid-1 and to whole *M. Leprae* in Leprosy patient: evolution during therapy. **Int. J. Lepr.other Micobact. Dis.**, v.5, n.2, p. 256-76, 1986.

BAGSHAW, A. F.; GARSIA, R. J.; BAUMGART, K.; ASTBURY, LYN. IgM Serum Antibodies to Phenolic Glycolipid-1 and Clinical Leprosy: Two Years Observation in a Community with Hyperendemic Leprosy. **Int.J. Lepr.**, v.58, p. 25-30, 1990.

BAKKER, M.; HATTA, M.; KWENANG, A.; FABER, W R.; VAN BEERS, S M.; KLATSER, P R.; OSKAM, I. Population survey to determine risk factors for *M. Leprae* transmission and infection. **Int. J. Epidemiol.**, v. 33, p. 1329- 1336, 2004.

BAKKER, M. **Epidemiology and prevention of Leprosy**: a cohort study in Indonesia. 2005, 165f. Tese (Doutorado) - Departamento de Pesquisa Biomédica. Royal Tropical Institute. Amsterdam, 2005.

BARRETO, J.G; GUIMARÃES, L.S; LEÃO, M.R.N; FERREIRA, D.V; LIMA, R. A. ; SALGADO, C.G. **Lepr Rev** (2011) **82**, 358-370.

BARROS, R. P. C.; OLIVEIRA, M. L. W. R. Detecção de Anticorpos Específicos para o Antígeno glicolípido fenólico do *M. leprae* (anti-PGL- 1 e IgM): aplicações e limitações. **Anais Bras. Dermatol.**, v. 75, n. 6, p. 745-53, 2000.

BERA, A.; BANERJEE, A. Studies on lipids in mycobacterial cell wall: their important structure and function relating to pathogenicity and their biological activity. **Indian J. lepr.**, v. 61, p.143-50, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde; Organização Mundial de Saúde-OMS; Organização Pan Americana de Saúde-OPAS. **Manual para o Controle da Lepra**. Wasghington: MS/OMS/OPAS, 1989. p.48-62.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Dermatologia Sanitária (PNDS). **Controle da Hanseníase**: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio der Janeiro: DNDS/NUTES, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da Hanseníase**. Brasília: MS, 2000. n.3.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia para o Controle da Hanseníase**. Brasília: MS, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Epidemiológica. **Programa Nacional de eliminação da hanseníase em nível municipal**. Brasília: MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hanseníase**. Informe de Atenção Básica. Brasília: MS, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hanseníase no Brasil**: dados e indicadores selecionados. Brasília-DF: SVS/DVE/PNCH, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde**: Relatório da Situação da Hanseníase no Pará. Brasília – DF:MS, 2009b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 3.125**, de 7 de outubro de 2010. Aprova as Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da Hanseníase. Brasília: MS, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Procedimentos Técnicos**: baciloscopia em hanseníase. Brasília: MS, 2010b.

BRASIL. Ministério da Saúde. SINAN. **Hanseníase: casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Brasília:MS, 2011.

BRENNAN, P.J; BARROW, W.W. Evidence for Species specific lipid antigens in Mycobacterium Leprae. **Int. J. Lepr Other Mycobact Dis.**, v.48, p.382-7, 1980.

BRENNAN, P.J.; MAYER, H.; ASPINALL, G.O.; NAM SHIN, J.E. Structures of the glycopeptidolipid antigens from serovars in the mycobacterium avium- M.intracellulaire – M. scrofulaceum serocomplex. **Eur. J. Biochem**, v.115, p. 7-15, 1981.

BRETT, S J.; PAYNE, S N.; GIGG, J.; DRAPER, S N. Analysis of the major antigenic determinants of the characteristic phenolic glycolipid from *M. Leprae*. **Clin. Exp. Immunol.** v.56, p. 89-96, 1984.

BRETT, S. J.; PAYNE, S. N.; GIGG, J.; BURGESS, P.; GIGG, R. Use of synthetic glycoconjugates containing the *M. Leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of Leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.64, p. 476-83, 1986.

BRITO, M. F. M.; XIMENES, R. A. A.; GALLO, M. E. Associação entre reação hansênica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti-PGL-1 e baciloscopia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, supl.2, p.47-72, 2008.

BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy. **The Lancet**, v.363, n. 9416, p.1209-1219, abr.2004

BÜHRER-SÉKULA, S. **A Simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae***. 1998, 123 f. Tese (Doutorado em Imunologia) - Departamento de Pesquisa Biomédica. Royal Tropical Institute. Amsterdam, 1998.

BÜHRER-SÉKULA, S. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. **Immunol. Med. Microbiol.**, Netherlands, v.21, supl.3, p. 197-201, jul. 1998.

BÜHRER-SÉKULA, S. **A Simple dipstick assay for leprosy**: development, evaluation and application. University of Amsterdã, 2000. Disponível em: < <http://dare.uva.nl>>. Acesso em: 20 set. 2011.

BÜHRER-SÉKULA, S.; CUNHA, M.G.; FOSS, N.T. ; OSKAM, L.; FABER, W.R.; KLATSER, P.R. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increasead risk of relapse. **Trop. Int. Health England**, v.6, p.317-326, abr. 2001.

BÜHRER-SÉKULA, S. A Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with risk of developing leprosy. **Int. J. Other Mycobact.Dis.**, United States, v.41, supl.5, p.1991-95, maio, 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. PGL-I leprosy serology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, Supl.2, p.3-5, 2008.

BUCHANAN, T. M.; YOUNG, D. B.; MILLER, R. A.; KHANOLKAR, S. R. Serodiagnosis of infection with *M. leprae*. **Int. J. lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.51, n.4, p. 524-30, 1983.

CALADO, K. L. SAMPAIO. Inquérito sorológico com ML Flow em contatos de pacientes de hanseníase no município de Duque de Caxias- RJ. Dissertação de Mestrado- UFRJ, 2005.

CELLONA, R. V. et al., Cross- sectional assessment of ELISA reactivity in leprosy patients, contacts, and normal population using the semisynthetic antigen natural disaccharide octyl

bovine serum albumin (ND-O-BSA) in Cebu, the Philippines. **Int.J.lepr.**,v.61,n.2, p.192-198, 1993.

CHANTEAU, S.; CARTEL, J.L.; GUIDI, C.; PLICHART, R.; BACH, M.A. Soroepidemiological study on 723 household contacts of leprosy patients in French Polynesia using the disaccharide-octyl-BSA as antigen. **Int. J. Lepr.other Mycobact. Dis.**, v. 55, p. 625-32, 1987.

CHANTEAU, S.; CARTEL, J.L.; ROUX, J. Leprosy serology: current status and perspectives. **Acta Leprol.**, v.8, p. 65-70, 1992.

CHO, S. N.; YANAGHARA, D. I.; HUNTER, S. W.; GELBER, R. H.; BRENNAN, P. J. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *M.Leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, v.41, p. 1077-1083, 1983.

CHO, S. N.; FUJIWARA, T.; HUNTER, S. W.; REA, T. H.; GELBER, R.H. ; BRENNAN, P. J. Use na artificial antigen containing the 3,6- di- O- methy- beta- D- glucopyranosil epitope for the serodiagnosis of leprosy. **J. Infect. Dis.**, United States, v. 150, supl. 3, p. 311-322, set. 1984.

COLE, S.T; EIGLMEIER, K; PARKHILL, J. Massive Gene decay in the leprosy *Bacillus*. **Nature**, v. 409, n.6823, p.1007-11, 2001.

COSTA, M. PENA; GOULART, I. M.B. Testes sorológicos anti-PGL-1 no monitoramento do tratamento da hanseníase. Universidade Federal de Uberlândia-UFU, 2008.

CUNHA, M. G. S.; FOSS, N. T. **Níveis de anti-PGL-1 no soro de pacientes com hanseníase tratados com quinolona e poliquimioterapia.** Ribeirão Preto, SP. 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto- UNAERP. 1998.

DE LA BARRERA, S; FINIASZ, M.; FINK, S. Differential development of CD4 and CD8 cytotoxic T cells (CTL) in PBMC across the leprosy spectron. IL6 with IFN- γ or IL-2 generate CTL in multibacillary patients. **Int J Lepr.**1997.

DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. **Immunol Cell Biol**, v. 78, p.318-324, 2000.

DOAN, T.; MELVOLD, R.; VISELLI, S.; WALTENBAUGH, C. **Imunologia ilustrada.** Porto Alegre: Artmed, 2008.

DRAPER, P. Structure of mycobacterium leprae. **Leprosy Review**, v. 57, Supl. 2, p.15-20, 1986.

DÜPRE, N.C. Efetividade do BCG-ID em comunicantes de pacientes com as formas multibacilares da hanseníase. Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, ENSP, 1998.

DÜPRE, N.C et al., Impacto of PGL-1 seropositivity on the protectivity effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLOS Negl Trop Dis*. 2012, june 19. Doi: 10.1371/journal. Pntd. 0001711.

FAKHOURI, R.; SOTTO, M. N.; MANINI, M. I. P.; MARGARIDO, L. C. Nodular Leprosy of childhood and tuberculoide leprosy: a comparative, morphologic, immunopathologic and quantitative study of skin tissue reaction. **Int. J.lepr.**, v. 71, n.3, p.218-226, 2003.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. **Diagnóstico laboratorial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

FINE, P. E.; PONNINGHAUS, J. M.; BURGESS, P.; CLARKSON, J. A.; DRAPER, C. C. Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. **Int. J. lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.56, n.2, p. 243-254, 1988.

FONTELLES, MAURO JOSÉ. **Bioestatística aplicada à pesquisa experimental**: volume 1/ Mauro José Fontelles. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2012.

FOSS, N.T. Aspectos imunológicos da hanseníase. **Medicina Ribeirão Preto**, v.30, p. 335-339, jul./set.1997.

FOSS, N.T.; CALLERA, F.; ALBERTO, F.L. Anti-PGL-1 levels in leprosy patients and their contacts. **Brazilian J. Med.Biol. Res.**, v.26, p.43-51, 1993a.

FUJIWARA, T.; HUNTER, S.W. CHO, S N.; ASPINALL, G. O.; BRENNAN, P. J. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigen from the leprosy bacillus and preparation of a dsaccharid protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. **Infect. Immun.**, Unitd States, v.43, supl. 1, p.245- 252, jan. 1984.

GALLO, M. E.; OLIVEIRA, M. L. W. Recidivas e reinfecções em Hanseníase. **Medicina Ribeirão Preto**, v.30, n.3, jul./set. 1997.

GARCÍA, V.E.; UYEMURA, K.; SIELING, P.A.; OCHOA, M.T.; MORITA, C.T.; OKAMURA, H. et al. IL-18 promote type 1 cytokine production from NK cells in human intracellular infection. **J. Immunol.**, v.162, n.10, p.6114-21, 1999.

GONZÁLEZ-ABREU, E.; PON, J.A.; HERNÁNDEZ, P.; RODRIGUEZ, J.; MENDOZA, E.; HERNÁNDEZ, M. et al. Serological reactivity to a synthetic analog of phenolic glycolipid I and early detection of leprosy in an area of low endemicity. **Lepr. Rev.**, v. 67, n.1 p. 84-12, 1996.

GOULART, I.M.B; MINEO, J.R; FOSS, N.T. Production of transforming growth factor-beta 1(TGF- β_1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.122, p.330-334, 2000.

GOULART, I. M. B; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, supl. 4, p. 365-75. 2002.

GOULART, I. M. B; SOUZA, D.O.B; MARQUES, C.R; PIMENTA, V.L; GONÇALVES, M.A; GOULART, L.R. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.15,n. 1, p.101-105, jan.2008.

GROSSI, M.A.F. **Noções de hansenologia**. In: Informe Técnico da Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, 1987.

GROENEN, G; PATTYN, S.R; CHYS, P; TSHILUMBA, K; KUYKENS, L; COLSTON, M. J;YALISOMBO. Study Group- A longitudinal study of incidence of leprosy in a Zaire with special reference to PGL- 1 antibody results. **Int. J. Lepr. other Mycobact. Dis.**, v.53, n.4, p. 641-50, 1990.

HARBOE, M. The immunology of leprosy. In: Hastings R. C. **Leprosy**.1st ed. NewYork: Churchill Livingstone Inc., 1985. p. 53-87.

HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J. A novel phenolic glycolipid from M.Leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J. Bacteriol.** v.147, p. 728-735, 1981.

HUNTER, S. W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P. J. Structure and Antigenicity of the Major Specific Glycolipid Antigen of *Mycobacterium Leprae*. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 15072-78, 1982.

ILA TECHNICAL FORUM. Report of the International Leprosy Association Technical Forum, Paris 25-28. February, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS-INPE. **Projeto PRODES.** Monitoramento da Floresta Amazonica Brasileira por Satélite. Disponível em:<www.obt.inpe.br/prodes>. Acesso em: 20 jan. 2012.

JAGANNATH, C.; SEGUNPTA, N. Serology of leprosy.I. Indirect hemagglutination test with stabilized sensitized red cells. **Lepr. Ind.**, v.53, p.507-512, 1981.

JOPLING, W.H.; McDOUGALL, A.C. **Manual de Hanseníase.** 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1991.

KANG, T.J; LEE, S.B; CHAE, G.T. A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine**, v.20, n.2, p.56-62, 2002.

KALFMAN, S. H. E. Cell-mediated immunity. In: HASTINGS, R. C. **Leprosy.** 2.ed. London: Churchill Livingstone, 1994. p.157-168.

KLATSER, P. R., *et al.* Evaluation of Mycobacterium leprae antigens in the monitoring of a dapsone-based chemotherapy of previously untreated lepromatous patients in Cebu, Philippines. **Leprosy Review**, Paris, v. 60, p. 178-186, 1989.

KLATSER, P. R.; CHO, S.N.; BRENNAN, P.J. The contribution of serological tests to leprosy control. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.64, p.63-66, 1996.

KRUTZIK, S. R.; OCHOA, M.T.; SIELING, P.A.; UEMATSU, S.; NG, Y.W.; LEGASPI, A. *et al.* Activation and Regulation of Toll-Like Receptors 2 and 1 in Human Leprosy. **Nat. Med.**, v.9, n.5, p. 525-532, 2003.

KAZDA, J.; IRGENS, M.; KOLK, A. H. J. Acid-fast found in sphagnum vegetation of coastal Norway containing Mycobacteria leprae-specific phenolic glycolipid-1. **Int. J. Lepr.**, v.58, p.353-357, 1990.

LAFERT, J.; ABREU, E.G.; ROBAINA, R.; VEREZ, V. Ultramicroelisa para la detección de anticuerpos IgM anti *M. Leprae*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.33, n.6, p.491-495, nov./dec. 1991.

LEVY, B. **Comunicação em Ciências da Saúde: hanseníase.** Disponível em: <portaldeleitutawordpress.com./tag.hanseníase>. Acesso em 10 maio 2012. (Portifólio. Arquivo de etiquetas: foto *M.Leprae.*).

LOMBARDI, C; PEDRAZZINI, E.S; PEDRAZZINI, J.C; FERREIRA FILHO,P; ZICKER,F. Eficácia protetora del BCG contra lepra em São Paulo, Brasil. **Boletim da oficina sanitária panamericana.**, v.119, n. 5, p. 415-421. 1990.

MADEIRA, S. Aspectos microbiológicos do *M. Leprae* In: OPRMOLLA, D. V. A. **Noções de Hansenologia.** São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000. p.13.

MADDSON, S. E.; STEWART, C. C.; FARSHY, C. E; REIMER, C B. The relationship of race, sex, and age to concentrations of serum immunoglobulins expressed in international units in healthy adults in the USA. **Bull World Health Organ**, v.52, n.2, p 179-185, 1975.

MAGALHAES, Maria C. C.; ROJAS, Luisa I. Diferenciação territorial da hanseníase no Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.16, n. 2, p.75-84, Jun. 2007.

MARTELLI CMT, MORAIS OL, ANDRADE ALSS, SILVA SA ET AL.Spatial patterns of leprosy in an urban area of central Brazil. **Bull World Health Organ.**, v. 73, n.3, p.315-9, 1995.

MARTELLI, C. M. T; STEFANI, M. M. A; PENNA, G.O; ANDRADE, A.L.S.S. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: Hanseníase. **Rev. Bras. Epidemiol.** v.5, n. 3, 2002.

MELSOM, R.; HARBOE, M.; NAAFS,B. Class specific anti- mycobacterium leprae antibody assay in lepromatous (BL-LL) patients during the first two to four years of DDS treatment. **Int.J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.51, p. 271-81, 1982.

MENDONÇA, V.A.; COSTA, R.D.; MELO, G.E.B.A.; ANTUNES, C.M.; TEIXEIRA, A.L. Imunologia da Hanseníase. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n.4. p.343-50, 2008.

MENZEL, S.; HARBOE,M.; BERGSVIK, H.; BRENNAN, J P. Antibodies to a synthetic analog of phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium Leprae* in healthy household contacts of patients with leprosy. **Int. J.Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.55, p. 617-625, 1987.

MOURA, R. A.; WADA, C.S.; ADHEMAR PURCHIO, A.; ALMEIDA, T.V. **Técnicas de laboratório.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

MÜLLER, R.A.; GORDER, D.; HARNISCH, J.P. Antibodies to phenolic glycolipid-1 during long-term therapy: serial measurements in individual patients. **Int. J. Lepr Other Mycobact. Dis.**, v. 55, p. 636-636, 1987.

MITIE, T. R. F.; OLIVEIRA, L. R.; MELO, C. S.; NAKAMURA, P. M.; RIMOLO, N. S.; CAVALARI, S. F. et al. Aplicação do teste ELISA Anti-PGL-1 em localidade com alta endemicidade de hanseníase na região Norte do Estado de São Paulo. **Hans.Int.** São Paulo, v. 23, n.2, p.35-48,1998.

MULIYIL,J.; NELSON, K.E.; DIAMOND, E.L., 1991. Effect of BCG on the risk of leprosy in an endemic area: a case-control study.**International Journal of Leprosy**, 59: 229-236.

MODLIN, R.L; HOFMANN F.M; TAYLOR, C.R; REA, T.H. In situ characterization of T lymphocyte subsets in leprosy granulomas. **In J Lepr Other mycobact Dis.** v. 50, n.3, p. 361-2, 1982.

MODLIN, R. L. Th1-Th2 paradigma: insights from leprosy. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.102, p. 828-832, 1994.

MODLIN, R. L. Learning from Leprosy: Insights into Contemporary Immunology from an Ancient Disease. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.15. p. 1-6, 2002.

MOET, F; SCHURING, R; PAHAN, D. The Prevalence of previously undiagnosed leprosy in the general population of northwest Bangladesh. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.2, n.2, p. e198, feb. 2008.

MOURA, R.C.; CALADO, K.L.; OLIVEIRA, M.L.W.; BÜHRER-SÉKULA, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-1: revisão sistemática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, supl.2, 2008.

OLIVEIRA, M.L.W. **Cura da hanseníase:** magnitude das recidivas no Brasil, estudo de coortes de diferentes esquemas terapêuticos e fatores de risco. Rio de Janeiro, 1996. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 1996.

OLIVEIRA, C. R.; ALENCAR, M. J. F.; SANTANA, S. C.; NASCIMENTO, G F.; SENA NETO, S. A. Estudo de fatores que influenciam a inadequação do diagnóstico e acompanhamento dos estados reacionais nos pacientes com hanseníase no Estado de Rondônia. **Hansenol. Int.** (online), v.32, n.2, 2007.

OLIVEIRA, M.L.W; CAVALIERE, F.A.M; MACIEIRA, J.M.P; BÜHRER-SÉKULA, S. O uso da sorologia como ferramenta adicional no apoio ao diagnóstico de casos difíceis de hanseníase multibacilar: lições de uma unidade de referência. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.41, supl.2, p.27-33, 2008.

OPROMOLA, D. V. A. **Noções de Hansenologia**. Bauru, SP: Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato," 2000.

OREGE, P.A; FINE, P.E; LUCAS, S.B; OBURA, M.; OKELO, C., OKUKU,P. Case-control study of BCG vaccination as a risk factor for leprosy and tuberculosis in Western Kenya. **Int J Lepr. Other Mycobact Dis**. 1993.

PAYNE, N.S.; DRAPER, P.; REES, R.J.W. Serological activity of purified glycolipid from *M. Leprae*. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 50, p. 220-221, 1992.

PENNA, G.; PINTO, L.F.; SORANZ, D.; GLATT, R. High incidence of diseases endemic to the Amazon region of Brazil, 2001-2006. **Emerg Infect Dis.**, v.15, n.4, p.626-32, 2009.

PONNIGHAUS JM, FINE PE, BLISS L. Certainty levels in the diagnosis of leprosy. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 55, p. 454-462, 1987.

PONNIGHAUS, J.M.; FINE, P.E.M.; STERNE, J.A.C.; MALEMA, S.S.; BLISS, L.; WILSON, R.J. Extended schooling and good housing conditions are associated with reduced risk of leprosy in rural Malawi. **Int. J. Leprosy**, v. 62, p. 345-352, 1994.

QUARESMA, J.A.S.; OLIVEIRA, M.F.A.; GUIMARÃES, A.C.R.; BRITO, E.B.; BRITO, R.B.; PAGLIARI, C.; BRITO, A.C.; XAVIER, M. B.; DUARTE, M.I.S. CD1a and Factor XIIIa Immunohistochemistry in Leprosy: A Possible Role of Dendritic Cells in the Pathogenesis of *Micobacterium leprae* Infection. **Am. J. Dermatopathology**, v. 31, n.6, p. 527-531, ago. 2009.

QUARESMA, J.A.S.; ALMEIDA, F.A.C.; AARÃO, T.L.S.; SOARES, L.P.M.; MAGNO, I.M.N.; FUZII, H.T.; LIBONATI, R.M.F.; XAVIER, M.B.; PAGLIARI, C.; DUARTE, M.I.S. Transforming growth factor β and apoptosis in leprosy skin lesions: possible relationship with the control of the tissue immune response in the *Mycobacterium leprae* infection. **Microbes Infect.**, v.14, n.9, p.696-701, aug. 2012.

RICHARDUS, J.H; HABBENA, J.D. The impact of leprosy control on the transmission of *M. leprae*: is elimination being attained? **Lepr Rev**. v.78, n.4, 2007.

RIDLEY, D.S; JOPLING, W.H. Classification of Leprosy according to immunity. A five-system. **Int. J. Leprosy**, v. 34, p.255-73, 1966.

ROITTER, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo: Manole, 1999.

ROSEAN, G. **Uma história de Saúde Pública**. São Paulo: Unesp, Hucitec, Abrasco; 1994.

SALGADO, C.G; FERREIRA, D.V.G; FRADE, M.A.C; GUIMARÃES, L.S; SILVA, M.B; BARRETO, J.G. High anti-phenolic glycolipid-1 Titers and hidden leprosy cases, Amazon Region. **Emerg Infect Dis.**, n.18, p. 889-890, may, 2012.

SAMPAIO, E.P.; MOREIRA, A.L.; KAPLAN, G.; ALVIM, M.F.S.; DUPPRE, N.C.; MIRANDA, C.F.; SARNO, E.N. Mycobacterium leprae-induced Interferon- γ production by household contacts of Leprosy patients: Association with Development of Active Disease. **J. Infect. Dis.**, v.164, p.990-993, 1991.

SANTOS, A.R.; SUFFYS, P.N; VANDERBORGHT, P.R. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphism in leprosy. **J Infect. Dis.**, v.86, n.11, p. 1687-91, 2002.

SANTOS, A.P.; ALMEIDA, G.G.; MARTINEZ, C.J.; RESENDE, C. Imunologia da Hanseníase. **NewsLab**, v.73, p. 142-156, 2005.

SENGUPTA, U. Mycobacterium leprae antigens and their utility in immunodiagnostics of leprosy. **Trop Med Parasit.**, v.41, p. 361-2, 1990.

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

SILVA, C.L; FOSS, N.T. Tumor necrosis in leprosy patients. **J Infect Dis.** 1989; 159 (4): 789-90

SILVA, R. C. **Estudo do comportamento dos Testes Sorológicos ML FLOW e ELISA (PGL-1) em área endêmica e não endêmica de hanseníase**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

SILVA, D. R. X.; IGNOTTI, E.; SANTOS, R.S.; HANCON, S.S. Hanseníase, condições sociais e desmatamento na Amazônia brasileira. **Rev.Panam. Salud Publica.**, v.27, n.4, p. 268-75, 2010.

- STANLEY, S.J.; HOWLAND, C.; STONE, M.M.; SUTHERLAND, I. BCG vaccination of children against leprosy in Uganda: final results. **J. Hygiene of Cambridge**, v.87, p. 233-248, 1981.
- STEFANI, M.M.A.; MARTELLI, C. M. T.; MORAIS-NETO, O.L.; MARTELLI, P.; COSTA, M.B.; ANDRADE, A. L.S. S. Assessment of anti-PGL-1 as prognostic marker of reaction. **Int. J. Lepr.** v. 66, n. 3, p. 356 – 364, 1998.
- SOEBONO, H.; KLATSER, P.R. A seroepidemiological study of leprosy in high-and low-endemic Indonesian Villages. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.59, p.416-425, 1991.
- STITES, D. P; TERR, A. L; PARSLOW, T. G. **Imunologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 49-52.
- SAUNDERSON, P.; GROENEN, G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES Project, Alert, Ethiopia. **Lepr. Rev.**, 2000.
- TALHARI, S.; NEVES, R. G. **Hanseníase**. 3. ed. Manaus: Inst. Med.Trop. do Amazonas, 1997.
- TALHARI et al., **Dermatologia Tropical. Hanseníase**. 4. ed. Manaus: Inst. Med. Trop. do Amazonas, 2006.
- TOMIMORI-YAMASHITA, J.; CRUAUD, P.; ROTTA, O.; LAGRANGE, P.H. Antibody-based enzyme-linked immunosorbent. **Lepr Rev.**, v. 70, n.3, p. 261-271, 1999.
- TOMIMORI-YAMASHITA, J.; MAEDA, S. M.; JABUR, R.; ROTTA, O. **Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos**. **An. Bras. Dermatol.**, v. 71, n. 4, p. 343-9, 1996.
- TOMIMORI-YAMASHITA, T. J.; NGUYEN, T.H.; MAEDA, S. M.; FLAGEUL, B.; ROTTA, O.; CRUAUD, P. Anti-phenolic glycolipid-1 (PGL-1) determination using blood collection on filter paper in leprosy patients. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.41, n.4, jul./ago.1999.
- TRYPATHY, S.P. BCG trial in leprosy in Índia. **Indian J. Leprosy**, v.56, p. 686-687, 1984
- VASCHULA, M.; HOLZER, T.J.; ANDERSEN, B.R. Suppression of monocyte oxidative response by phenolic glycolipidic 1 of Mycobacterium Leprae. **J. Immunol.**, v. 142, n.10, p. 1696-701, 1989.

VAN BEERS; HATTA, M; KLATSER, P.R. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-1 among school children as an indicator of leprosy endemicity, **Int J Lepr Other Mycobact Dis.**, v.67, p.243-249, 1997.

VISSA, V. D.; BRENNAN, P. J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. **Genome Biol.** v.2, n.8, 2001. Disponível em: <<http://genomebiology.com/2001/2/8/reviews/1023.1>>. Acesso em: 20 jan. 2012.

VOLTARELI, J.C. **Imunologia Clínica na Prática Médica.** São Paulo: Atheneu, 2009.

WEISS, E; MAMELAK, A.J; LA MORGIA, S; WANG, B; FELICIANI,C; TULLI, A; SAUDER, D.N. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.50, p.657-675, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Expert Committee on Leprosy.** Sixth Report. 768. Geneve: WHO, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Weekly epidemiological record.** August, 2010.

YAMASHITA, J. T; CRUAD, P; PAPA, F; ROTTA, O; DAVIS, L.H. Circulating immune complexes in leprosy sera: demonstration of antibodies against mycobacterial glycolipid antigens in isolated immune complexes. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.61, n.1, p. 44-50, 1993.

YAMASHITA, J. T; NAGUYEN, T.H; MAEDA, S.M; FLAGEUL, B; ROTTA, O; CHUAUD, P. Anti-phenolic glycolipid-1 (PGL-1) determination using blood collection on filter paper in leprosy patients. **Rev Inst Med Trop. São Paulo**, v.41, n.4, p. 239-42, jul./ago. 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global Leprosy Situation.** 2009. Disponível em: < [http:// www ,who int.](http://www.who.int)> Acesso em: 10 jun. 2011.

YAMAMURA M, UYEMURA K, DEANS RJ, WEINBERG K ET AL. Defining protective responses to pathogens: cytokines profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, p. 277-9, 1991.

YAWALKAR, S.J. **Leprosy for medical practitioners and paramedical workers.** Novartis Seven Edition. Basle, Witzerland.: Foundation for Sustainable Development, 2002.

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

APÊNDICES

APENDICE - A TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO		
OBRIGATÓRIO PARA PESQUISA CLÍNICA EM SERES HUMANOS RESOLUÇÃO Nº 196 DE 10/10/1996- CNS		
1) Identificação do paciente ou responsável legal		
Nome:		
Documento de identidade nº:	Nascimento: ____/____/____	
Endereço:		
Cidade:	Estado:	Telefone:
2) Dados sobre o estudo		
Título: Parâmetro de referencia para soro positividade do teste anti-PGL-1 na Hanseníase em áreas endêmicas do Estado do Pará		
Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em:		
3) Esclarecimento do participante da pesquisa		
<p>Você está convidado a participar de um estudo que pretende colaborar com o controle da hanseníase em nossa região. Estamos desenvolvendo um trabalho que pretende contribuir para um melhor de melhor desempenho de um exame de laboratório que auxilia no diagnóstico da hanseníase. Para que esse trabalho aconteça, precisamos da colaboração de doadores de sangue que nunca tiveram Hanseníase e nem seus familiares. O que você precisa fazer: doar 5ml de sangue para poder ser examinado no Instituto Evandro Chagas. O procedimento não trará nenhum risco para você, ao contrário sua doação poderá trazer benefícios para nossa população. MARIA HELIANA CHAVES MONTEIRO DA CUNHA Núcleo de Medicina Tropical –UFPa. Pesquisadora.</p>		
Autorizo o uso do material destinado ao laboratório da Unidade de Saúde.		
Belém, ____/____/____.		
Assinatura do doador ou responsável		

APÊNDICE B – FICHA EPIDEMIOLÓGICA

PARÂMETRO DE REFERÊNCIA PARA SOROPOSITIVIDADE DO TESTE ANTI-PGL – 1 NA HANSENÍASE NO ESTADO DO PARÁ

FICHA EPIDEMIOLÓGICA PARA SELEÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.

Data do Atendimento: ___/___/_____

Município: _____

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Tempo de moradia no endereço registrado: _____

Data do nascimento: _____ Naturalidade: _____ Est. Civil: _____

Profissão: _____ Ocupação habitual: _____

Tempo na ocupação registrada: _____ (meses ou anos)

Escolaridade: _____ (1º, 2º ou 3º grau completo ou incompleto, analfabeto, semi-analfabeto, sabe assinar o nome)

Casos de Hanseníase na família: Sim (); Não ()

Cicatriz da vacina BCG: Sim (); Não ()

ANEXOS

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°050 /2008-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** PARÂMETRO DE REFERÊNCIA PARA SOROPOSITIVIDADE DO TESTE ANTI-PGL1 NA HANSENÍASE EM ÁREAS ENDÊMICAS DA REGIÃO AMAZÔNICA.
3. **Pesquisador Responsável:** Maria Heliana Chaves Monteiro da Cunha
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 10/10/2008.
6. **Data do Parecer:** 28/10/2008.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela durante a reunião realizada no dia 28/10/2008. Considerando que foram atendidas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS, manifestou-se pela aprovação do parecer do relator.

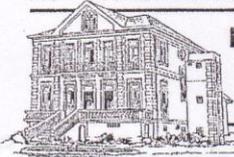
Parecer: **APROVADO**

Belém, 05 de novembro de 2008.

Profº Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

ANEXO B – DOCUMENTO DE PERMISSÃO PARA USO DO LABORATÓRIO DO IEC

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE

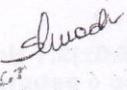


**INSTITUTO
EVANDRO
CHAGAS**

DECLARAÇÃO

DECLARO para os devidos fins que os testes sorológicos referentes à realização do Projeto intitulado “Parâmetro Referência para Soropositividade ao teste anti-PGL-I na hanseníase em Áreas Endêmicas da Região Amazônica” de autoria da docente Maria Heliana Chaves Monteiro da Cunha da Universidade Federal do Pará – UFPA, serão realizados, com a nossa aquiescência, no Laboratório de Hanseníase do Instituto Evandro Chagas.

Ananindeua, 18 de setembro de 2008



SOCCIT
Pesquisadora
Laboratório

Maria do Perpétuo Socorro C. Amador
Pesquisadora do IEC-Laboratório de hanseníase

ANEXO C



TESTE DE DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM DIRIGIDOS CONTRA PGL-I DO *Mycobacterium leprae* por meio de um Enzimaimunoensaio (ELISA) padrão.

O teste de detecção de anticorpos IgM para hanseníase utiliza como antígeno, fração semi-sintética (NT-P-BSA – Natural disaccharide + Phosphate + Bovine serum albumin)) do Glicolípido fenólico I (PGL-I) do *M. leprae*, um antígeno de parede celular espécie-específico desta micobactéria. Usa-se um conjugado IgM anti-humano ligado a uma enzima- a peroxidase que quando em contato com o substrato (tetrametilbenzidine –TMB) converte a reação em cor azul que, quando bloqueada pelo ácido sulfúrico (H₂SO₄) torna-se amarela.

Resumidamente a técnica é executada da seguinte maneira:

1. Cobertura das placas NUNC 96 “well” em U com o antígeno NT-P-BSA
2. Lavagem da placa com tampão salina fosfato (PBST) + tween 20 4 vezes, sendo que o tempo de espera na 1^a. Lavagem deve ser de 5 minutos e nas seguintes de um minuto cada uma.
3. Após lavagem, bater bem a placa em papel toalha para retirar todo o líquido. Adicionar 100 uL de solução de PBST a 1% de BSA (soro-albumina-bovina) em toda a placa e incubar por uma hora em estufa bacteriológica a 35°C.
4. Trazer a placa da estufa e retirar toda a solução de BSA batendo bem a placa em papel toalha. Diluir os soros a serem testados, o soro standart, o controle positivo e o controle negativo com solução de PBST a 10% de NGS (Normal Goat serum) em uma proporção de 1:300 (5 uL de soro para 1,5 mL da solução) em tubos 12 x 74 e distribuir na placa nos referidos lugares conforme figura 1. e 2 .Incubar na estufa por uma hora.

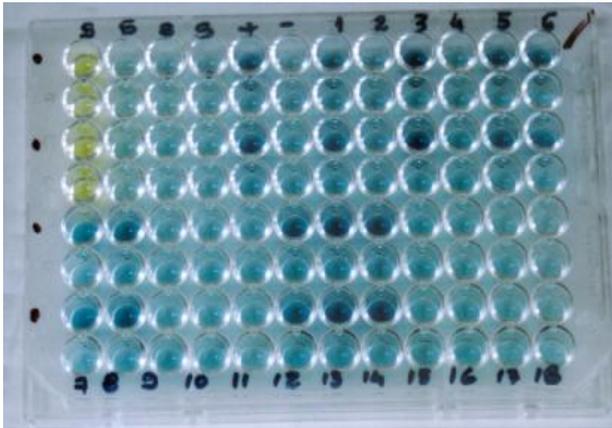


Figura 1 - Placa equipada com NT-P-BSA após bloqueio do 1º Standart com ácido sulfúrico (H₂SO₄)

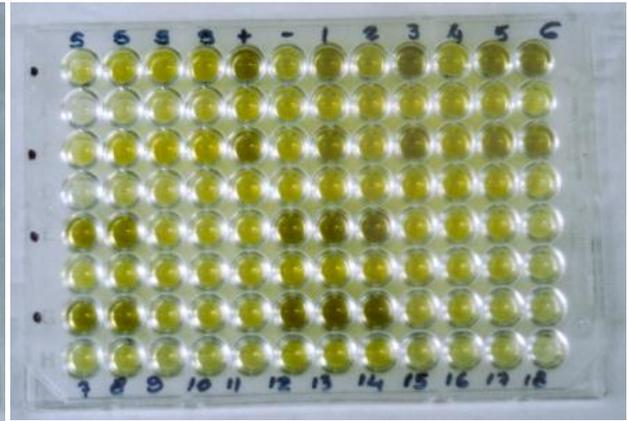


Figura 2 - Microplaca NUNC 96 well equipada com NT-P-BSA após bloqueio total com H₂SO₄ e para leitura final.

5. Após a incubação, trazer a placa, lavar novamente 4 vezes e adicionar o conjugado anti-IgM humano-Peroxidase diluído a 1:2000) em PBST a 10% de NGS – 5 mL de PBST para 2,5 uL de IgM. Adicionar 50 uL por poço em toda a placa e incubar novamente por uma hora.

6. Trazer a placa, lavar novamente 4 vezes (1 minuto de espera em cada lavagem), adicionar 50 uL/poço de substrato tetrametilbenzidine e deixar a placa dentro de uma cuba tampada por um período de 1 a 10 minutos, tendo o cuidado de monitorar a reação que torna a solução nos poços de cor azul, quanto mais forte o tom de azul, mais próxima se torna a hora de bloquear a reação com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5 N e ler no equipamento (leitor de ELISA) para medir a absorbância. Bloqueia-se com ácido o 1º Standart, lê-se a placa, se a densidade ótica estiver próxima de 0,6, então bloqueia-se a placa toda e se realiza a leitura final no equipamento.

Laboratório de Hanseníase do Instituto Evandro Chagas – IEC

Pesquisador responsável: Maria do Perpétuo Socorro C. Amador

ANEXO D – RESOLUÇÃO Nº 215- SESPA

C I B	COMISSÃO INTERGESTORES BIPARTITE SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA - SESPA COLEGIADO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ - COSEMS /PA	CIB
-------	---	-----

Resolução nº 215, de 29 de novembro de 2010.

A Comissão Intergestores Bipartite do Estado do Pará – CIB/PA, no uso de suas atribuições legais e,

- **Considerando** a Portaria GM/MS nº 399, de 22/02/2006, que contempla o Pacto entre os gestores do SUS, nas suas três dimensões: Pela Vida, em Defesa do SUS e de Gestão;

- **Considerando** a Portaria GM/MS nº 699, de 30/03/2006, que regulamenta as Diretrizes Operacionais Pactos pela Vida e de Gestão, em que destaca a Regionalização como o eixo estruturante do Pacto de Gestão;

- **Considerando** a Resolução nº 44, de 03/04/2009, retificada pela Res. CIB pela Res. CIB nº 78, de 26/05/2010, que pactua a constituição dos Colegiados de Gestão Regional.

- **Considerando** a Portaria GM/MS nº 2.691, de 19/10/2007 que regulamenta as condições para transferência de recursos financeiros federais referentes ao incentivo para apoiar as ações de regionalização no Sistema Único de Saúde;

- **Considerando** que regionalização orienta a descentralização das ações e serviços e potencializa os processos de pactuação e negociação entre gestores, sendo que o seu avanço depende da construção de desenhos regionais que respeitem as realidades locais e de Colegiados de Gestão Regional – CGRs fortalecidos como espaços ativos de co-gestão.

- **Considerando** a pactuação intergestores da Macro Região Norte que definiu o desmembramento da referida Macro Região de Saúde, como estratégia para avançar no processo descentralização da saúde;

- **Considerando** ainda, a deliberação consensual da Comissão Intergestores Bipartite, em na reunião ordinária do dia 26/11/2010.

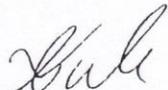
Resolve:

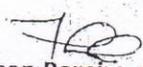
Art. 1º – Repactuar o desenho de Regionalização do Estado do Pará, que passa a ser conformado por 08 (oito) Macro Regiões de Saúde e 23 (vinte e três) Regiões de Saúde/Colegiados de Gestão Regionais, nos termos do anexo desta resolução.

Parágrafo Único: o Plano Diretor de Regionalização do Estado do Pará (PDR/PA), bem como os demais planos estruturantes de saúde aprovados pela CIB deverão ser revisados, em conformidade à pactuação definida por esta resolução.

Art. 2º – Esta resolução entra em vigor na data de sua publicação.

Belém, 29 de novembro de 2010.


Cláudio do Nascimento Vale.
 Secretário de Estado de Saúde Pública.
 Presidente da CIB/Pará.


Fredson Pereira da Silva.
 Presidente do COSEMS/PA.

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

C I B	COMISSÃO INTERGESTORES BIPARTITE SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA - SESPA COLEGIADO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ - COSEMS /PA	CIB
-------	---	-----

Anexo da Resolução nº 215, de 29/11/2009.

I - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO EXTREMO NORTE
1.1- COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE MARAJÓ ORIENTAL
Municípios
1 - Afuá 2 - Cachoeira do Arari 3 - Chaves 4 - Muaná 5 - Ponta de Pedras 6 - Salvaterra 7 - São Sebastião da Boa Vista 8 - Santa Cruz do Arari 9 - Soure
1.2 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE MARAJÓ OCIDENTAL
Municípios
1. Anajás 2. Bagre 3. Breves 4. Curralinho 5. Gurupá 6. Melgaço 7. Portel
II - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO NORTE
2.1- COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE METROPOLITANA
MUNICÍPIOS
1 - Ananindeua 2 - Belém 3 - Benevides 4 - Marituba 5 - Santa Bárbara do Pará
2.2 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE RODOVIA PA-140/RIO GUAJARÁ-MIRI
MUNICÍPIOS
1 - Colares 2 - Santo Antônio do Tauá 3 - São Caetano de Odivelas 4 - Vigia
2.3 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE RODOVIA PA-140/RIO CAPIM
MUNICÍPIOS
1 - Acará 2 - Bujaru 3 - Concórdia do Pará 4 - Santa Izabel do Pará 5 - Tomé-Açu

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

C I B	COMISSÃO INTERGESTORFS BIPARTITE SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA - SESPA COLEGIADO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ - COSEMS /PA	CIB
-------	---	-----

III - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO NORTE-LESTE	
3.1 - - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE DO BAIXO TOCANTINS	
Municípios	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Baião 2. Cametá 3. Limoeiro do Ajuru 4. Mocajuba 5. Oeiras do Pará 	
3.2 - COLEGIADO DE GESTÃO REGIÃO DE SAÚDE ALÇA VIARIA	
Municípios	
<ol style="list-style-type: none"> 1-Abaetetuba 2- Barcarena 3-Igarapé-Miri 4-Moju 5-Taiândia 	
IV - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO NORDESTE	
4.1 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE RODOVIA BR 010	
Municípios	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Aurora do Pará 2. Capitão Poço 3. Garrafão do Norte 4. Ipixuna do Pará 5. Irituia 6. Mãe do Rio 7. Nova Esperança do Piriá 8. Paragominas 9. Santa Maria do Pará 10. São Miguel do Guamá 11. Ulianópolis 	
4.2 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE DO RIO GUAMA	
Municípios	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Castanhal 2. Curuçá 3. Igarapé-Açu 4. Inhangapi 5. Magalhães Barata 6. Maracanã 7. Marapanim 8. São Domingos do Capim 9. São Francisco do Pará 10. São João da Ponta 11. Terra Alta 	

[Handwritten signature]

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

C I B	SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA - SESPA COLEGIADO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ - COSEMS /PA	CIB
-------	---	-----

IV - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO NORDESTE
4.3 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE DA BACIA ATLÂNTICO-CAETÉS
Municípios
1. Augusto Corrêa
2. Bonito
3. Bragança
4. Cachoeira do Pirá
5. Capanema
6. Nova Timboteua
7. Ourém
8. Peixe-Boi
9. Primavera
10. Quatipuru
11. Salinópolis
12. Santa Luzia do Pará
13. Santarém Novo
14. São João de Pirabas
15. Tracuateua
16. Viseu

V - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO CENTRO - OESTE
5.1 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE DA ROD. TRANSAMAZÔNICA
Municípios
1. Altamira
2. Anapú
3. Brasil Novo
4. Medicilândia
5. Pacajá
6. Porto de Moz
7. Senador José Porfírio
8. Uruará
9. Vitória do Xingu

[Handwritten signature]

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.



C I B	COMISSÃO INTERGESTORES BIPARTITE SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA - SESPA COLEGIADO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ - COSEMS /PA	CIB
-------	---	-----

VI - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO OESTE
6.1 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE DA CALHA NORTE
Municípios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Faro 2. Juruti 3. Óbidos 4. Oriximiná 5. Terra Santa
6.2 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE DO RIO TAPAJÓS
Municípios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Aveiro 2. Itaituba 3. Jacareacanga 4. Novo Progresso 5. Trairão
6.3 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE DO BAIXO AMAZONAS
Municípios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Alenquer 2. Almeirim 3. Belterra 4. Curuá 5. Monte Alegre 6. Placas 7. Prainha 8. Santarém 9. Rurópolis

Hull

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

C I B	COMISSÃO INTERGESTORES BIPARTITE SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA - SESPA COLEGIADO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ - COSEMS /PA	CIB
-------	---	-----

VII - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO SUDESTE	
7.1 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE ITACAIUNAS TOCANTINS	
Municípios	
1. Itupiranga 2. Jacundá 3. Marabá 4. Nova Ipixuna	
7.2 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE LAGO TUCURUI	
Municípios	
1. Breu Branco 2. Goianésia do Pará 3. Novo Repartimento 4. Tucuruí	
7.3 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE SERRA DOS CARAJAS	
Municípios	
1. Canaã dos Carajás 2. Curionópolis 3. Eldorado dos Carajás 4. Parauapebas	
7.4 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE SERRA DAS ANDORINHAS	
Municípios	
1. Brejo Grande do Araguaia 2. Palestina do Pará 3. Piçarra 4. São Domingos do Araguaia 5. São Geraldo do Araguaia 6. São João do Araguaia	
7.5 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE RODOVIA BR 222	
Municípios	
1. Abel Figueiredo 2. Bom Jesus do Tocantins 3. Dom Eliseu 4. Rondon do Pará	

Perfil de anticorpos anti-PGL-1, ELISA, em indivíduos sadios em áreas endêmicas em hanseníase do Estado do Pará.

C I B	COMISSÃO INTERGESTORES BIPARTITE SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE PÚBLICA - SESPA COLEGIADO DE SECRETÁRIOS MUNICIPAIS DE SAÚDE DO ESTADO DO PARÁ - COSEMS /PA	CIB
-------	---	-----

VIII - MACRO REGIÃO DE SAÚDE DO SUL
8.1 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE ARAGUAIA
Municípios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Conceição do Araguaia 2. Floresta do Araguaia 3. Santa Maria das Barreiras
8.2 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE PLANALTO DO ARAGUAIA
Municípios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Bannach 2. Cumarú do Norte 3. Pau D'Arco 4. Redenção 5. Santana do Araguaia
8.3 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE ENTRE RIOS
Municípios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Rio Maria 2. Sapucaia 3. Xinguara
8.4 - COLEGIADO DE GESTÃO: REGIÃO DE SAÚDE ARAGUAIA-XINGU
Municípios
<ol style="list-style-type: none"> 1. Água Azul do Norte 2. Ourilândia do Norte 3. São Félix do Xingú 4. Tucumã

