

A relação entre soroprevalência de anticorpos contra o glicolípido fenólico-I entre crianças em idade escolar e endemicidade da hanseníase no Brasil

The relation between seroprevalence of antibodies against phenolic glycolipid-I among school children and leprosy endemicity in Brazil

Samira Bühler-Sékula¹, Stella van Beers¹, Linda Oskam¹, Rita Lecco²,
Elisabete Santos Madeira³, Marco Antonio Lopes Dutra⁴, Magali Chaves Luis⁵,
William R. Faber⁶ e Paul R. Klatser¹

RESUMO

Os programas de controle da hanseníase se beneficiariam de um método fácil para estimar prevalência e avaliar o impacto das ações de controle na prevalência da doença. A determinação da soroprevalência de anticorpos contra PGL-I através de estudos com crianças em idade escolar foi sugerida como indicador útil da taxa de prevalência da hanseníase a nível municipal. Para investigar se a soropositividade estaria associada aos coeficientes de detecção da hanseníase e se poderia ser usada como indicador da prevalência em outras áreas, 7.073 crianças em três estados endêmicos de hanseníase no Brasil foram testadas. Resultados mostram uma considerável variação da distribuição de soropositividade nas comunidades, independente do número de casos de hanseníase detectados. A soroprevalência foi significativamente menor nos colégios. Nenhuma diferença na distribuição da soropositividade determinada por ELISA ou dipstick foi observada. Nenhuma correlação entre o coeficiente de detecção da hanseníase e soropositividade pôde ser estabelecida.

Palavras-chaves: Hanseníase. Sorologia. Epidemiologia. Estudo com escolares.

ABSTRACT

Leprosy control programs would benefit expressively from an easy method to estimate disease prevalence and to assess the effect of leprosy control measures on disease prevalence. Determination of the seroprevalence of antibodies to PGL-I through school children surveys might be a useful indicator of leprosy prevalence at the district level. To investigate whether seropositivity rates could be related to leprosy detection rates and whether seropositivity could be used as a proximal indicator to predict the leprosy incidence in other areas, 7,073 school children in three different leprosy-endemic states in Brazil were tested. The results show a widely varying distribution of seropositivity in the communities independent of the number of leprosy cases detected. Seroprevalence was significantly lower at private schools. No differences in the patterns of seropositivity between ELISA and dipstick were observed. No correlation between leprosy detection rate and seropositivity rates could be established.

Key-words: Leprosy. Serology. Epidemiology. School children survey.

Apesar dos esforços para eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, o registro de casos novos da doença detectados no mundo aumentou de 571.792 em 1990 para 755.305 em 1998²⁰, representando um aumento de 32% na última década. Uma explicação otimista para esse aumento na detecção

poderia ser a contribuição de ações de busca ativa nas campanhas de eliminação da hanseníase (LECs). Porém, para garantir seu controle e, talvez, eliminação a longo prazo, deve-se estudar peculiaridades do patógeno e da doença em geral. A transmissão silenciosa da hanseníase é facilitada pelas características do bacilo e da doença como: a reprodução lenta, o longo período de incubação antes do aparecimento da doença, o progresso crônico de danos neurais irreparáveis e o estigma social.

O conhecimento referente ao diagnóstico e tratamento da hanseníase vai se reduzir com a integração em andamento dos programas verticais de controle dentro do sistema de saúde pública¹⁷. A integração implica que profissionais menos experientes diagnosticam e classificam a hanseníase. Em comunidades onde a hanseníase já foi eliminada como problema de saúde pública, menos de um caso de hanseníase seria diagnosticado para cada 10.000 habitantes¹⁸. A maioria dos profissionais de saúde pode nunca encontrar um paciente de hanseníase e talvez nem incluir

1. KIT Biomedical Research, Instituto Real Tropical, Amsterdã, Holanda e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil. 2. Laboratório de Referência da Secretaria de Saúde Pública, Vitória, Espírito Santo, Brasil. 3. Secretaria de Saúde Pública do Estado do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil. 4. Universidade Federal de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 5. Universidade Federal de Florianópolis, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 6. Departamento de Dermatologia, *Academic Medical Center*, Universidade de Amsterdã, AZ Amsterdã, Holanda

Endereço para correspondência: Dra. Samira Bühler-Sékula. Departamento de Imunologia, sala 335/Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG. Rua 235, s/nº; Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil.

Fone: 55 62 3209 6111

e-mails: buhrersecula@iptsp.ufg.br; samira@buhler.net

hanseníase como diagnóstico diferencial se acredita que já foi eliminada. Além disso, o estigma social da hanseníase não necessariamente será eliminado junto com a doença, e isso continuaria a dissuadir os pacientes a se apresentar. Quando as condições socioeconômicas se mantêm iguais em uma área de alta endemicidade, a suscetibilidade na comunidade também persistirá. Em áreas endêmicas onde a eliminação da hanseníase supostamente tenha ocorrido, a incidência oculta poderá manter a transmissão silenciosa ao longo de vários anos, podendo reverter o status de *eliminado* para até *altamente endêmico*.

Para avaliar se o sistema de saúde é capaz de controlar a hanseníase, o programa deve ser monitorado, mas isso apresenta certas dificuldades. O indicador epidemiológico utilizado para monitorar o número de casos de hanseníase é o coeficiente de detecção e não a incidência, devido à dificuldade de achar todos os casos. As campanhas de busca ativa não são eficientes para doenças de baixa incidência como a hanseníase. Atualmente, não há alternativa para determinar a endemicidade de hanseníase em uma determinada área.

A detecção de anticorpos contra *Mycobacterium leprae* é potencialmente útil para estudos epidemiológicos sobre a infecção de *Mycobacterium leprae*, e assim talvez pudesse ser útil para avaliar os programas de controle da hanseníase^{12,13}. Visto que a prevalência de soropositividade em uma população reflete aproximadamente a taxa de exposição/infecção, o impacto das ações de controle poderia ser avaliado com testagem sorológica repetida^{2,9}. Na Indonésia, a mensuração da soroprevalência aos anticorpos contra PGL-I em escolares mostrou que esta poderia ser um indicador útil da prevalência geral da hanseníase a nível municipal¹⁶.

Neste artigo relatamos os resultados de um estudo epidemiológico realizado no Brasil utilizando o ML Dipstick para detectar a soropositividade entre 7.073 crianças em idade escolar em três estados endêmicos de hanseníase. Investigamos se as taxas de soropositividade se relacionam aos coeficientes de detecção da hanseníase e se a soropositividade poderia ser utilizada como indicador da incidência da hanseníase em uma dada região.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O Brasil está dividido em 26 estados e um Distrito Federal, e esses são subdivididos em um total de 5.507 municípios, que podem variar extensivamente em termos de área e população.

O nosso objetivo foi estudar três estados brasileiros com níveis diferentes de incidência da hanseníase. Para inclusão no estudo, essa incidência--estimada pelo coeficiente de detecção da hanseníase--deve ser confiável e os estados devem ter programas de controle bem estabelecidos. Portanto, analisamos os indicadores epidemiológicos e operacionais disponíveis para a hanseníase durante os cinco anos anteriores. Os critérios de seleção da área do estudo foram: (i) presença de uma equipe de trabalho comprometida e atuante nos últimos 5 anos, (ii)

diagnóstico precoce de casos novos, e (iii) implementação de poliquimioterapia (PQT) em pelo menos 90% dos pacientes. Para identificar as áreas de estudo, os dados epidemiológicos (taxas de detecção, prevalência, e grau de incapacidade em casos novos) e operacionais (cobertura de PQT, % de casos avaliados para grau de incapacidade e % de cura entre a coorte de pacientes por período) foram analisados.

Os estados incluídos foram Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG) e Santa Catarina (SC), nos quais os coeficientes de detecção de hanseníase em 1998 foram 4,1; 1,6 e 0,4 por 10.000, respectivamente. Baseado nos mesmos critérios listados acima, três municípios foram selecionados em cada Estado--Aracruz (ES), Santa Teresa (ES), Colatina (ES), Governador Valadares (MG), Santa Luzia (MG), Barbacena (MG), Itajaí (SC), Tubarão (SC) e Laguna (SC). Em cada Estado um coordenador do projeto realizou o levantamento com a assessoria dos programas municipais de controle da hanseníase da Secretaria Municipal de Saúde, professores e alunos universitários.

População de estudo

As crianças na quinta série do ensino fundamental foram estudadas no intuito de ter uma população-alvo entre 10-14 anos. Todos os procedimentos com sujeitos humanos seguiram a regulamentação das autoridades locais e o projeto teve aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (619/99 REG CONEP: 806). As crianças que receberam o consentimento livre e esclarecido dos pais foram examinadas clinicamente para presença de dermatoses e, quando necessário, encaminhadas a unidades de saúde para tratamento.

Tamanho da amostra

O tamanho da amostra depende da prevalência estimada da característica a ser estudada e do grau de precisão requerido da estimativa. Nesse estudo, os cálculos do tamanho da amostra foram baseados na estimativa da soroprevalência e no grau de precisão de 5% ($\pm 3\%$), 15% ($\pm 4\%$) e 25% ($\pm 5\%$) para as áreas de baixa, média e alta endemicidade respectivamente. A precisão da estimativa foi baseada em intervalos de confiança de 95%. Essas estimativas tiveram base em outro estudo com escolares¹⁶.

Devido ao fato que o método de amostragem por clusters foi utilizado, o tamanho da amostra também depende do efeito do desenho, que se relaciona ao número de clusters e a homogeneidade da característica entre eles^{3,15,19}. Por motivos práticos e lógicos, escolhemos uma amostra de 750 crianças com desenho de amostragem de 25 clusters com 30 pessoas em oito municípios e de 30 clusters com 25 pessoas em um município.

Esse desenho confirmaria a prevalência estimada e grau de precisão necessário enquanto corrige para um efeito de desenho de 2 a 5 nas áreas de baixa endemicidade, 1,9 a 3 nas áreas de média endemicidade e 1,3 a 4,2 nas áreas de alta endemicidade.

O número total de crianças participando nos 9 municípios dos três estados foi 7.073.

Seleção de clusters

Para a seleção das *escolas clusters*, uma lista de todas as escolas no município foi preparada e as escolas selecionadas por amostragem com probabilidade proporcional ao tamanho. Isso requer que a chance de ser selecionado não seja igual para todas as escolas, mas proporcional ao tamanho de cada uma. Dependendo do tamanho da escola mais *salas de aula clusters* podem ser selecionadas do mesmo colégio. No próximo passo, a turma da quinta série a ser incluída na amostra foi selecionada aleatoriamente. Se não houvesse alunos suficientes nessa turma, outra seria selecionada de forma aleatória. Em Santa Teresa e Laguna todas as quintas séries foram incluídas no estudo devido ao número limitado de crianças na população em estudo.

Coleta de sangue

Aproximadamente 10µl de sangue capilar foi coletado para uso direto no ensaio dipstick. O sangue foi obtido de todas as crianças por meio de punção digital e coletado em um tubo capilar heparinizado para hematócrito⁵. Além disso, 3 gotas de sangue foram coletadas em cartões 3 x 5cm de papel de filtro GB 002 (Schleicher & Schuell). Cada cartão foi identificado com etiqueta contendo numeração única, nome, data de nascimento e data da coleta de sangue do aluno. Após os cartões secarem, foram armazenados em sacos plásticos fechados a + 4°C.

Teste de dipstick

O teste dipstick para detecção de anticorpos anti-PGL-I do *Mycobacterium leprae* foi preparado conforme descrito anteriormente⁶. Os dipsticks têm duas linhas: uma do antígeno que consiste de epítipo dissacarídeo imunodominante específico do PGL-I ligado a albumina de soro bovino (*Dissacarídeo Natural-BSA* ou ND-O-BSA)⁸ e uma linha de controle interno de anticorpos IgM anti-humano que se liga às moléculas IgM do soro. O reagente de detecção de IgM consiste de anticorpos anti-IgM monoclonais e liofilizados ligados a um corante coloidal. Os dipsticks foram molhados em água destilada durante 15 segundos e depois incubados por 1 hora em um frasco de reação com 200µl do reagente de detecção reconstituído e aproximadamente 10µl de sangue total heparinizado⁵. No final do período de incubação, os dipsticks foram lavados com água da torneira e secados em temperatura ambiente. Uma linha de antígeno com coloração avermelhada indica uma reação positiva. Os resultados foram registrados como positivo quando se observou a coloração; a ausência de coloração (com uma fita de controle positiva) foi registrada como negativo.

Os resultados dos testes dipstick realizados em Santa Luzia não foram incluídos porque não foi possível observar a coloração positiva da linha de controle em uma alta proporção deles. Nos outros 8 municípios, todos os testes exibiram coloração na linha de controle positiva.

Eluição do sangue

O sangue foi eluído no dia anterior ao teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Dois discos com diâmetro de 3,17mm foram perfurados do papel absorvente com o sangue

e eluídos durante a noite em 50µl de solução salina fosfato tamponada com 0,1% (v/v) Tween 20 (PBST). Os dois discos continham aproximadamente 5µl de sangue, correspondente a aproximadamente 2,5µl de soro. No dia seguinte, uma diluição final de soro 1:100 foi obtida pela adição de 200µl de PBST com 10% (v/v) soro normal de cabra (NGS) pelo menos uma hora antes do uso nas placas ELISA.

ELISA

O ELISA para a detecção de anticorpos IgM contra o PGL-I do *Mycobacterium leprae* foi realizado conforme descrições anteriores⁴. ND-O-BSA foi utilizado como o análogo semi-sintético do PGL-I. Esse antígeno foi diluído em solução carbonada tamponada (pH 9,6) em uma concentração de açúcar de 0,023µg/ml. Como controle, 0,1µg/ml de albumina de soro bovino (BSA) foi utilizado. Placas (*Nunc-Immunoplates-II* de *Life Technologies, Taastrup*, Dinamarca) foram cobertas com 50µl/poço de antígeno ou controle. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C em câmara úmida. As placas foram bloqueadas por 60 minutos com 100µl de BSA 1% (w/v) em PBS. Em seguida, 50µl do sangue eluído foi adicionado a cada poço. Após incubação a 37°C durante 60 minutos as placas foram lavadas quatro vezes em PBST. O conjugado peroxidase-IgM anti-humano (*Capple/Organon Teknika*, Turnhout, Bélgica) foi adicionado (50µl/poço) em diluição de 1:2000 em PBST-10% NGS. Após incubação a 37°C por 60 minutos, o procedimento de lavagem foi repetido e 50µl de substrato líquido Sigma 3,3',5,5'-tetrametila-benzidina (TMB) foi colocado em cada poço. Para controlar a variação diária e entre placas, um soro positivo de referência foi incluído em quadruplicata em cada placa. As reações da placa inteira foram paradas com 50µl 2.5N H₂SO₄ quando em 450nm a leitura da densidade óptica (DO) do controle de referência chegou a 0,6. Todos os soros foram testados em duplicata e os resultados do ELISA expressos como a absorbância média entre as duplicatas. O valor final de DO de cada amostra de soro foi calculado pela subtração do valor DO das paredes revestidas com BSA do valor DO das paredes revestidas com ND-O-BSA. O valor de corte usado para positividade foi de DO=0,150; qualquer critério para positividade é arbitrário visto que a concentração de anticorpos tem distribuição unimodal¹⁰.

Análise dos dados

Os dados foram analisados usando Epi-info versão 6.04b e o aplicativo Microsoft Excel. As análises de variância foram aplicadas conforme indicado no texto. Todas as probabilidades apresentadas são bilaterais. A heterogeneidade da soroprevalência dentro de clusters diferentes foi examinada com o teste de aderência (*goodness-of-fit*) ($\sum[(O - E)^2/E]$).

Os valores de kappa expressam a concordância além daquela devida à chance. Geralmente, um índice kappa de 0,60 a 0,80 representa uma concordância substancial além da chance e um valor >0,80 representa concordância quase perfeita além da chance¹.

RESULTADOS

Características geográficas e demográficas

O tamanho da população, área e densidades populacionais dos municípios estão apresentados na **Tabela 1**. A variação entre os municípios foi alta. A concentração de habitantes variou de 29 a 672 pessoas por km².

TABELA 1

Características geográficas e demográficas por município (1998).

	População	Área (km ²)	Densidade populacional (pessoas/km ²)
Minas Gerais			
Governador Valadares	231.421	2.349	99
Santa Luzia	157.926	235	672
Barbacena	109.769	758	145
Espírito Santo			
Aracruz	61.339	1.427	43
Colatina	105.591	1.799	59
Santa Teresa	19.669	687	29
Santa Catarina			
Itajaí	130.777	303	432
Laguna	47.839	353	136
Tubarão	86.936	284	306

Indicadores de hanseníase

A **Tabela 2** apresenta os coeficientes de detecção da hanseníase para os 5 anos anteriores ao estudo.

A avaliação dos dados dos diferentes municípios mostra que a taxa de detecção da hanseníase ficou relativamente estável ao longo desses 5 anos na maioria dos municípios, exceto Santa

TABELA 2

Coeficiente de detecção da Hanseníase por município.

	Coeficiente de detecção/10.000					Média*
	1995	1996	1997	1998	1999	
Minas Gerais						
Governador Valadares	14,8	7,7	11,8	10,9	10,6	11,2
Santa Luzia	1,3	0,9	0,6	0,9	1,2	1,0
Barbacena	0,0	0,3	0,2	0,3	0,0	0,2
Espírito Santo						
Aracruz	3,0	3,8	4,4	4,8	2,3	3,7
Colatina	4,1	2,9	4,3	3,4	3,0	3,5
Santa Teresa	1,3	1,0	1,0	4,1	3,6	2,2
Santa Catarina						
Itajaí	1,6	1,5	0,4	0,8	0,3	0,9
Laguna	0,9	0,2	0,5	0,2	0,2	0,5
Tubarão	0,8	0,1	0,2	0,2	0,6	0,5

*Média da taxa de detecção 1995-1999.

Teresa (ES), que teve um aumento abrupto em sua detecção em 1998. Governador Valadares (MG) foi o município com maior coeficiente de detecção com uma média de 11,2/10.000. Aracruz (ES) e Colatina (ES) apresentaram coeficientes médios e semelhantes de 3,5-3,7/10.000 nesses 5 anos. Santa Luzia (MG), Barbacena (MG), Itajaí (SC), Laguna (SC) e Tubarão (SC), com taxas médias de detecção abaixo de 1/10.000 foram considerados municípios de baixa endemicidade.

População do estudo

A **Tabela 3** mostra as características da população de estudo. De todos os colégios registrados, 162 foram selecionados nos quais 224 clusters foram estudados.

TABELA 3

Características da população de estudo por município.

	Colégios				Alunos				
	n ^o	n ^o	n ^o	%	n ^o	n ^o	%	Idade	%
	Público	Particular	Clusters	Participação ¹	Registrados ²	Estudados	M/F	média	BCG ³
MG									
Gov. Valadares	28	0	30	45	6.779	843	50/50	12,1	99,9
Santa Luzia	19	0	25	51	4.871	787	46/54	12,1	99,6
Barbacena	12	0	25	51	2.304	755	43/57	11,8	100
ES									
Aracruz	12	3	26	84	2.612	815	49/51	11,4	97,9
Colatina	17	3	25	91	2.707	794	47/53	11,3	98,5
Santa Teresa	6	1	18	70	613	432	54/46	11,5	93,8
SC									
Itajaí	21	4	25	60	1.789	1014	48/52	11,7	98,9
Laguna	12	2	25	60	1.222	738	52/48	12,0	95,4
Tubarão	21	2	25	39	2.292	895	44/56	11,7	98,3

BCG: bacilo de Calmette-Guérin, MG: Estado de Minas Gerais, ES: Estado de Espírito Santo, SC: Estado de Santa Catarina.

M: masculino, F: feminino.

¹alunos convidados que receberam permissão dos pais para participar do estudo.

²número total de crianças na 5ª série.

³crianças vacinadas com BCG.

Dependendo da autorização dada pelos pais, a participação das crianças variou significativamente entre os municípios. Na **Tabela 3**, observa-se participação de 45% a 91%.

A razão masculino/feminino dentro dos municípios variou de 43:57 a 54:46. A idade média variou de 11,3 a 12,1 anos. A cobertura da vacina BCG foi quase 100% em todos os municípios. Houve uma diferença significativa na população do estudo entre os municípios em relação ao sexo (Qui-quadrado = 27,1, $p < 0,001$), idade (Teste F = 33,2, $p < 0,00001$) e status BCG (Qui-quadrado = 128,2, $p < 0,00000001$).

Sorologia

A **Tabela 4** exhibe os resultados do teste sorológico por ELISA e ML Dipstick. A concordância geral entre ELISA e o ML Dipstick foi de 90,2%, valor kappa 0,6. Os resultados de soropositividade variaram de 12% a 25% no ELISA e 8,5% a 14,4% no ML Dipstick. Nenhuma correlação entre o coeficiente de detecção da hanseníase e a soropositividade para ELISA e ML Dipstick pôde ser estabelecida. **Figura 1** mostra a porcentagem de soropositividade pelo ML Dipstick e ELISA em relação aos coeficientes de detecção da hanseníase.

TABELA 4

Taxa de soropositividade entre escolares por município.

	ELISA (%)			ML Dipstick (%)		
	soroprevalência	LI	LS	soroprevalência	LI	LS
Minas Gerais						
Governador Valadares	18,6	16,2	21,1	14,2	10,7	17,7
Santa Luzia	23,0	18,9	26,8	-	-	-
Barbacena	15,0	10,5	15,2	12,8	12,4	18,1
Espirito Santo						
Aracruz	24,0	22,8	25,3	14,4	11,2	17,5
Colatina	14,0	11,8	15,6	10,1	7,3	12,8
Santa Teresa	15,0	11,9	18,2	17,4	14,8	19,9
Santa Catarina						
Itajaí	16,9	14,7	19,0	14,2	12,5	15,9
Laguna	12,0	9,6	13,7	12,5	10,4	14,6
Tubarão	12,0	9,8	14,1	8,5	7,0	10,0

LI: limite inferior, intervalo de confiança 95%.

LS: limite superior, intervalo de confiança 95%.

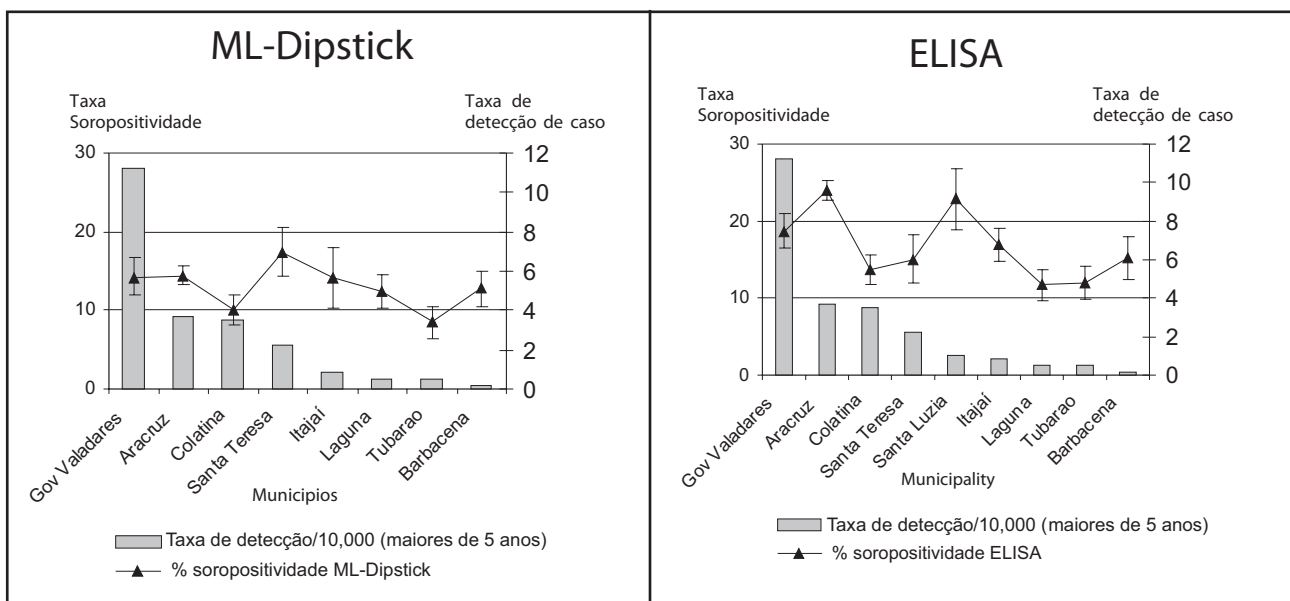


FIGURA 1

Soropositividade e taxa de detecção por município.

Para investigar como as taxas de soropositividade do ML Dipstick foram distribuídas entre os diferentes clusters e, conseqüentemente nas escolas, as taxas esperadas foram calculadas e comparadas com as observadas. Dos 145 escolas estudadas com o ML Dipstick em 8 municípios, 20 (13,8%) tiveram a soropositividade significativamente diferente da média observada no município. No total, havia 8 (5,5%) colégios

com uma soropositividade significativamente menor do que a esperada. Dentre as escolas particulares, a maioria apresentava soropositividade significativamente menor (5/15) do que a esperada quando comparados aos públicos (3/130). (Qui-quadrado = 19,2, $p < 0,002$). A **Figura 2** mostra a porcentagem de soropositividade por ML Dipstick e ELISA em escolas publicas e privadas.

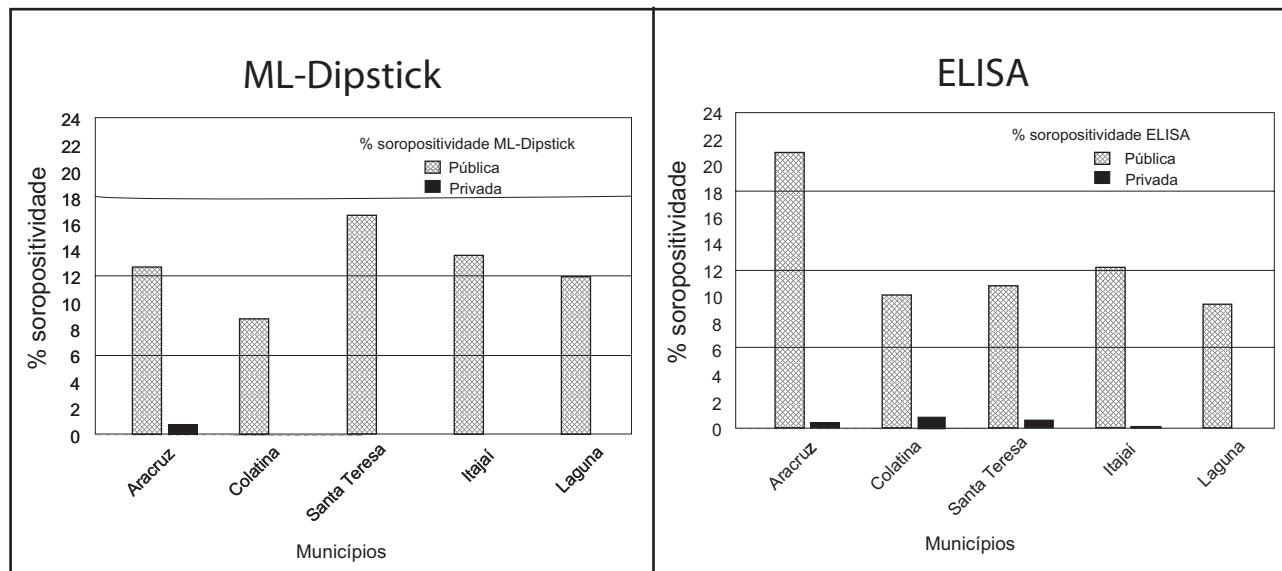


FIGURA 2

Seropositividade nos municípios onde escolas públicas e privadas foram estudadas.

DISCUSSÃO

Os programas de controle da hanseníase se beneficiariam de um instrumento de fácil uso para estimar a prevalência da doença e avaliar o impacto das ações de controle na prevalência. Isso ajudaria a monitorar e maximizar o efeito das intervenções. Em uma área endêmica de hanseníase na Indonésia se mostrou que as taxas de soropositividade de anticorpos anti-PGL-I encontradas em escolares podem ser um indicador útil para ver a prevalência da hanseníase a nível municipal¹⁶. Uma forte correlação foi encontrada, mas só dois níveis de endemicidade foram pesquisados. Neste estudo mais níveis de endemicidade foram incluídos bem como uma metodologia que pode ser utilizada facilmente no campo.

Incluímos clusters de crianças em idade escolar de 9 municípios em 3 estados do Brasil apresentando diferentes coeficientes de detecção da hanseníase. A soropositividade tanto usando o ELISA como o ML Dipstick foi estudada e os resultados comparados com os coeficientes de detecção registrados. Nossos resultados mostram uma distribuição amplamente variada na soropositividade das comunidades, independente do número de casos de hanseníase detectados. Esses resultados não coincidem com os do estudo com escolares na Indonésia¹⁶. A soropositividade não foi capaz de diferenciar entre os diferentes níveis de endemicidade de hanseníase e não houve nenhuma relação entre a soropositividade e os indicadores de hanseníase. Nenhuma diferença no comportamento da soropositividade entre ELISA e o dipstick foi observada.

Ao supor que a soropositividade seja um indicador de infecção, pode haver várias explicações porque encontramos uma soropositividade amplamente distribuída na comunidade:

- i) A infecção subclínica do *Mycobacterium leprae* pode ser difundida mas a imunidade da população previne o aparecimento da hanseníase;
- ii) O *Mycobacterium leprae* pode ser transmitido não só por contato com pacientes clínicos mas também por contato com os subclínicamente infectados, os bacilos de *Mycobacterium leprae* presentes no meio ambiente¹¹ ou um reservatório desconhecido; ou
- iii) Infecção na comunidade por micobactérias ambientais e/ou infecções comuns podem levar a uma resposta de reatividade cruzada do anticorpo anti-PGL-I.

Além desses fatores gerais, há vários outros relacionados ao desenho do estudo e à execução que possivelmente explicam por que nenhuma relação clara foi encontrada entre os indicadores de hanseníase e sorologia.

Primeiro, pode ser que as taxas de detecção oficiais nem sempre sejam corretas. A seleção dos municípios com taxas de incidência diferentes foi baseada nos dados e na experiência no Programa Nacional de Controle da Hanseníase. Somente os municípios com programas de controle da hanseníase estáveis durante os últimos anos foram incluídos. No entanto, não podemos excluir a possibilidade que em algumas áreas o número de casos ocultos de

hanseníase é maior que o esperado. Leboeuf e Grossi estimaram que só entre 59 e 84% de todos os casos da hanseníase no Estado de Minas Gerais foram detectados¹⁴. Isso pode explicar as taxas de soropositividade mais altas que o esperado encontradas em Santa Lucia e Barbacena, mas não em Governador Valadares onde a soropositividade foi menor que esperado.

Segundo, não podemos descartar a possibilidade que em alguns municípios a população de estudo não foi representativa para a população total. O desenho do estudo usando a amostragem por clusters através de levantamentos com escolares devia ter sido apropriado e, em princípio, o tamanho da amostra foi suficiente para representar a comunidade. Porém, a participação das crianças ficou dependente do consentimento dos pais e da sua presença no colégio na hora da execução da pesquisa. Esses fatores poderiam ter introduzido um viés. É possível que, especialmente nas áreas altamente endêmicas, as crianças que já são contatos intradomiciliares não recebam a permissão dos pais para participar do estudo por causa do estigma associado à doença. Fatores socioeconômicos poderiam ser outro motivo para não entrar na pesquisa. Durante a coleta de dados no campo, muitas crianças no Espírito Santo não compareceram ao colégio porque tiveram que ajudar com a colheita do café. De fato, o município mais endêmico de hanseníase (Governador Valadares) teve participação baixa.

Terceiro, o antígeno usado para determinar a soropositividade no estudo na Indonésia foi o semi-sintético trissacarídeo natural ligado à albumina de soro bovino por meio de um ligante fenólico (NT-P-BSA), que também foi usado no teste de aglutinação. Em nosso estudo, um antígeno semelhante foi utilizado, um semi-sintético dissacarídeo natural ligado a BSA por um ligante octil (ND-O-BSA). Uma boa correlação entre os dois antígenos foi observada ($r = 0,81$), a especificidade do NT-P-BSA sendo maior (95,4%) do que o ND-O-BSA (93,1%)⁷. Não podemos descartar a possibilidade que o uso de antígenos diferentes com especificidade diferente possa prejudicar a comparação dos resultados de pesquisas distintas. Alternativamente, o uso de sangue total em vez de soro pode ter desempenhado um papel nas diferenças.

Quando se analisam os 20 clusters nos quais a soropositividade foi menor ou maior que o esperado, uma diferença significativa foi encontrada entre os colégios particulares e públicos. Os particulares tinham maior probabilidade de apresentar uma soropositividade menor. Essa diferença é estatisticamente significativa e coincide com a hipótese que a soropositividade é um reflexo da exposição ao *Mycobacterium leprae* e provavelmente tem alguma associação com a classe socioeconômica. A diferença no status socioeconômico de alunos em colégios particulares comparado aos públicos pode ser a explicação mais coerente pela diferença na distribuição de infecção encontrada. Por outro lado, a soropositividade elevada observada nas escolas poderia ser resultado de reação cruzada. A exposição a outras micobactérias ambientais e, portanto, taxas de soropositividade maiores que o esperado, poderia ser só um reflexo da ligação não específica de anticorpos de reação cruzada em resposta ao antígeno.

Baseado nos nossos resultados, não é possível chegar a uma conclusão definitiva sobre a hipótese de que a soropositividade e a prevalência da hanseníase em uma comunidade se correlacionam.

AGRADECIMENTOS

À *Netherlands Leprosy Relief* (NLR) e ao fundo para *Scientific Research for the Tropics* (WOTRO) da NWO (Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek) que apoiaram esse estudo financeiramente. Agradecemos à Área Técnica de Dermatologia Sanitária do Ministério da Saúde representada por Dr. Gerson Fernando Mendes Pereira, e MORHAN, representado por Sr. Arthur Custódio Moreira Souza pela assistência ao estudo. Um agradecimento especial para Isabel Vöhringer que cortou e acondicionou os 15 mil testes do estudo. A todos os professores, pais, crianças, e profissionais de saúde envolvidos no estudo, gostaríamos de expressar nossos profundos agradecimentos. ND-O-BSA (Contract NO1 AI 55262, to CSU, PJB, PI) foi gentilmente fornecido por Dr. D. Chatterjee, Universidade do Colorado, Denver, USA.

REFERÊNCIAS

1. Altman DG. *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman & Hall, London, 1991.
2. Baumgart KWWJ, Britton RJ, Mullins A, Basten, Barnetson RS. Subclinical infection with *Mycobacterium leprae* - a problem for leprosy control strategies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87: 412-415, 1993.
3. Bennett S, Woods T, Liyanage WM, Smith DL. A simplified general method for cluster-sample surveys of health in developing countries. *World Health Statistics Quarterly* 44: 98-106, 1991.
4. Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R. Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. *Clinical and Experimental Immunology* 64: 476-483, 1986.
5. Bührer-Sékula S, Cunha MG, Ferreira WA, Klatser PR. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 21: 197-201, 1998.
6. Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Ingen CW, Klatser PR. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 133-136, 1998.
7. Chanteau S, Cartel JL, Roux J, Plichart R, Bach MA. Comparison of synthetic antigens for detecting antibodies to phenolic glycolipid I in patients with leprosy and their household contacts. *Journal of Infectious Diseases* 157: 770-776, 1988.
8. Chatterjee D, Cho SN, Brennan PJ, Aspinall GO. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1-4)-O-(2,3-di-O-me. *Carbohydrate Research* 156:39-56, 1986.
9. Cho SN, Kim SH, Cellona RV, Chan GP, Fajardo TT, Walsh GP, Kim JD. Prevalence of IgM antibodies to phenolic glycolipid I among household contacts and controls in Korea and the Philippines. *Leprosy Review* 63: 12-20, 1992.
10. Fine PE, Ponnighaus JM, Burgess P, Clarkson JA, Draper CC. Seroepidemiological studies of leprosy in northern Malawi based on an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic glycoconjugate antigen. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 56: 243-254, 1988.
11. Kazda J, Irgens LM, Kolk AH. Acid-fast bacilli found in sphagnum vegetation of coastal Norway containing *Mycobacterium leprae*-specific phenolic glycolipid-I. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 58:353-357, 1990.

12. Klatser PR. Laboratory techniques for diagnosis. *Tropical and Geographical Medicine* 46: 58-60, 1994.
13. Klatser PR, Cho SN, Brennan PJ. The contribution of serological tests to leprosy control. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 64: S63-S66, 1996.
14. Leboeuf MAA, Grossi MAF. Prevalência oculta de hanseníase nas áreas de abrangência das diretorias regionais de saúde de Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil, 2000.
15. van Beers S, Hatta M, Klatser PR. Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid-1 among school children as an indicator of leprosy endemicity. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases* 67:243-249, 1999.
16. Visschedijk J, Broek J, Eggen H, Lever P, Beers S, Klatser PR. *Mycobacterium leprae* - millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. *Tropical Medicine and International Health* 5:388-399, 2000.
17. World Health Organization. Handbook World Health Assembly and the Executive Board. World Health Organization. 3rd(III, 1985-1992) Geneva, p.117-118, 1993.
18. World Health Organization. Current global situation of leprosy. Latest available information, July 1999. World Health Organization, 2000.