

Hanseníase: considerações sobre o desenvolvimento e contribuição (institucional) de instrumento diagnóstico para vigilância epidemiológica

Hanseniasis: diagnostic instrument development and institutional contribution for epidemiologic surveillance

Maria do Perpétuo Socorro Amador Silvestre, Luana Nepomuceno Gondim Costa Lima
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Seção de Bacteriologia e Micologia, Ananindeua, Pará, Brasil

RESUMO

A hanseníase faz parte das doenças prevalentes no Estado do Pará. As antigas Colônia do Prata, em Igarapé-Açu, e Colônia Marituba, na região metropolitana de Belém, ambas no Pará, onde eram hospedados pacientes portadores do mal de Hansen, retratam uma realidade histórica da época em que os pacientes eram segregados e separados das respectivas famílias em função do contágio a que estavam expostas. O advento do tratamento multidroga ou poliquimioterápico, no Brasil na década de 1980, mudou consideravelmente o quadro da endemia no País, com uma redução acentuada da prevalência da doença; embora o aparecimento de casos novos não apresente redução significativa nos países endêmicos, ainda assim, o quadro epidemiológico sofreu mudanças substanciais nos últimos 20 anos. O Instituto Evandro Chagas (IEC), órgão de pesquisa da Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, iniciou estudos epidemiológicos e realizou atividades de vigilância em saúde pública referentes à hanseníase na década de 1990, mais precisamente, em 1998, quando aplicou um método laboratorial simples, denominado ML Dipstick, o qual pesquisa anticorpos da classe IgM contra o glicolípido fenólico-I (PGL-I), um antígeno de parede celular específico do *Mycobacterium leprae*, em cinco municípios endêmicos para hanseníase no Estado do Pará. Este estudo de revisão tem como objetivo descrever a trajetória do desenvolvimento do Programa de Hanseníase no IEC, bem como avanços e perspectivas futuras, relevantes no contexto da endemia hanseniana no Pará.

Palavras-chave: Hanseníase; Doenças Negligenciadas; História; Vigilância em Saúde Pública.

ABSTRACT

Hanseniasis is a prevalent disease in Pará State, Brazil. The old settlements Colônia do Prata (Igarapé-Açu) and Colônia Marituba (metropolitan area of Belém), both in Pará, were home to patients with hanseniasis and portray a historical reality of patient segregation and separation from their families because of their contagious disease. Multidrug treatment (polychemotherapy) was established in Brazil during the 1980s and led to a significant countrywide decrease in the prevalence of hanseniasis. Although there were no significant decreases in the number of new cases reported in endemic countries, the epidemiologic framework dramatically changed during the past 20 years. Instituto Evandro Chagas (IEC) is a research agency of the Health Surveillance Secretariat of the Ministry of Health, which conducted epidemiologic studies and performed public health surveillance on hanseniasis during the 1990s. In 1998, a simple laboratory method called ML Dipstick was used for identifying IgM antibodies against the phenolic glycolipid-I (PGL-I), a *Mycobacterium leprae*-specific antigen; and those studies were conducted in five endemic municipalities located in Pará State. This report aimed to describe IEC's Hanseniasis Program, as well as provide future perspectives on hanseniasis in Pará State.

Keywords: Hanseniasis; Neglected Diseases; History; Public Health Surveillance.

Correspondência / Correspondence:

Maria do Perpétuo Socorro Amador Silvestre
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, Seção de Bacteriologia e Micologia
Rodovia BR-316 km 7, s/n. Bairro: Levilândia – CEP: 67030-000 – Ananindeua, Pará, Brasil
E-mail: socorroamador@iec.pa.gov.br

HISTÓRICO DOS ESTUDOS SOBRE HANSENÍASE NO IEC

Nos dias atuais, fala-se em eliminação global da hanseníase, ou seja, estudos têm sido realizados, simulando a expressão do *Mycobacterium leprae* em uma população que identifica os chamados contatos intradomiciliares, estimando-se, portanto, que seja eliminada até o ano de 2020¹. Entretanto, mais de 200.000 novos casos de hanseníase são detectados no mundo anualmente². No Brasil, em 2012, foram diagnosticados 33.303 casos novos, 2.246 (7%) em menores de 15 anos de idade. Os Estados de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Pará e Maranhão foram classificados como hiperendêmicos, com mais de 40 casos novos por 100.000 habitantes em 2011³.

O Instituto Evandro Chagas (IEC), por meio da Seção de Bacteriologia e Micologia (SABMI), com apoio da Fundação Oswaldo Cruz e especificamente em colaboração com a dra. Samira Bühler-Sékula, na época pesquisadora do Royal Tropical Institute of Amsterdam, Holanda, iniciou inquérito sorológico para hanseníase no ano de 1998, com aplicação do ML Dipstick, um teste imunocromatográfico de leitura rápida (3 h), utilizando uma tira de nitrocelulose sensibilizada com antígeno trissacarídeo natural, ligado a um radical fenol e esse ligado a uma proteína, a albumina de soro bovino (BSA), o qual é identificado como NT-P-BSA antígeno semissintético e um controle contendo IgM anti-humana ligada a um corante vermelho (*Palanil red*)^{4,5}.

Posteriormente, no ano de 2002, foi realizado, na SABMI, o treinamento em serviço com o objetivo de implantação da técnica de enzaimunoensaio (ELISA), a qual consiste de um método "in house" que pesquisa anticorpos das classes IgM, IgA e IgG em amostras de soro de pacientes com hanseníase e contatos desses pacientes. O teste foi padronizado no Laboratório de Hanseníase do IEC e, na ocasião, foi realizada pesquisa de campo pela dra. Bühler-Sékula juntamente com a equipe do Laboratório de Hanseníase no Município de Curionópolis e na localidade de Serra Pelada (Serra Leste), ambos no Pará, considerados, na época, áreas hiperendêmicas para hanseníase; esse trabalho resultou na publicação: *Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy*⁶.

Em 2004, o Laboratório de Hanseníase do IEC, em colaboração com a Universidade de Viena, Áustria, realizou projeto para estudar alterações neurais na hanseníase por meio de imuno-histoquímica, utilizando o NGF-R (Neurotrophin Receptor Ab – 1 – Clone NGFR5) ou NCAM (CD56 LEU™), que são anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos humanos presentes nas células NK (*Natural Killer*) e células neuronais e não-neuronais, respectivamente, marcando as terminações nervosas dérmicas com precisão. O objetivo era determinar uma classificação imuno-histoquímica para o diagnóstico das formas precoces de hanseníase⁷.

No decorrer dos anos de 2005 a 2009, foram realizados vários estudos soroepidemiológicos em municípios hiperendêmicos do Estado do Pará, a fim de se determinar a magnitude do problema da hanseníase e investigar mecanismos de transmissão da doença, bem como áreas de maior risco para o aumento da prevalência e incidência da doença no Estado^{8,9,10,11}. Em 2011, foi concluído estudo de frequência genética para avaliar a suscetibilidade e a resistência para hanseníase, utilizando-se o polimorfismo da região 3' UTR (CAAA) identificada por Buu et al¹² do gene NRAMP1 (*natural resistance associated macrophage protein-1*). Outros estudos epidemiológicos realizados nesse período utilizaram a pesquisa de anticorpos IgM pelo método ELISA em amostras de saliva^{13,14}.

Em 2010, com a realização de concurso público para preenchimento de vagas do quadro de pesquisadores e pessoal técnico do IEC, tiveram início as atividades do Laboratório de Biologia Molecular, para estudos da transmissão da hanseníase em áreas endêmicas, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) do DNA de *M. leprae* em amostras de swab nasal, swab da linfa, e estudos do DNA humano de genes de citocinas pró-inflamatórias na hanseníase em amostras de sangue total associados com dados soroepidemiológicos, o que resultou na publicação de alguns artigos^{8,9,10,11,15}.

Entre 2014 e 2015, realizou-se um estudo inédito que utilizava antígenos semissintéticos derivados do glicolípido fenólico-I (PGL-I) do *M. leprae*, o dissacarídeo natural (ND-O-BSA) de produção norte-americana e o trissacarídeo natural (NT-P-BSA) de produção japonesa, mesclados e analisados de forma comparativa com os antígenos isolados em placas de ELISA; estudo preliminar sugeria melhor sensibilidade com o uso dos antígenos mesclados, comparados ao desempenho do antígeno trissacarídeo¹⁵.

Por fim, em setembro de 2015, houve um *workshop* para controle de qualidade do teste ELISA e teste de leitura rápida ML Flow no Laboratório de Hanseníase do IEC, em colaboração com a dra. Bühler-Sékula. Na ocasião, foram separados e liofilizados cerca de 800 tubos de antígeno trissacarídeo, gentilmente cedidos pelo prof. dr. Tsuyoshi Fujiwara da Universidade de Nara no Japão, material que poderá ser utilizado nos próximos 20 anos na pesquisa e nas ações de vigilância em saúde nos municípios hiperendêmicos do Estado do Pará.

ASPECTOS GERAIS E COMBATE À HANSENÍASE

Atualmente, a hanseníase continua sendo uma doença que não possui um teste padrão ouro para o diagnóstico, em virtude da incapacidade de se reproduzir o *M. leprae* em meios de cultura *in vitro*, portanto o diagnóstico ainda é essencialmente clínico. Métodos imunológicos e técnicas em Biologia Molecular têm sido estudados e propostos para fins diagnósticos, porém, até o momento, ainda não se conseguiu um teste 100% sensível e específico para

um diagnóstico de certeza tanto para formas precoces como para formas tardias¹⁶.

A identificação do maior antígeno de parede celular do *M. leprae*, o PGL-I, por Hunter e Brennan¹⁶ em 1981, possibilitou a produção de vários antígenos semissintéticos para estudos da imunidade humoral na hanseníase¹⁶.

O PGL-I identifica pacientes do polo virchowiano que induz à produção de grandes quantidades de anticorpos ou imunoglobulinas do tipo IgM, conferindo soropositividade de 80 a 100%; porém, entre pacientes do polo tuberculoide, ocorre fraca produção de anticorpos IgM ou baixos níveis de detecção, conferindo soropositividade de 30 a 60%^{17,18,19,20}.

Entre os contatos de pacientes com hanseníase, especialmente entre os que residem no mesmo domicílio com algum portador dessa doença, os quais são classificados como contatos intradomiciliares e são soropositivos para anti-PGL-I, existe um maior risco de desenvolverem hanseníase no futuro, comparados aos soronegativos¹⁹. O estudo de Douglas et al²¹ demonstrou um risco 30 vezes maior de o contato positivo ao PGL-I vir a adoecer de hanseníase, comparado ao negativo. Esses estudos sugerem que a infecção subclínica é mais comum que a manifestação da doença clínica^{21,22}.

A sensibilidade dos testes imunológicos para o diagnóstico, vigilância em saúde ou estudos epidemiológicos, sejam eles ELISA, testes imunocromatográficos de leitura rápida, ML Dipstick e ML Flow, é baixa entre pacientes do polo tuberculoide ou paucibacilares (PB), os quais podem não apresentar níveis de anticorpos anti-PGL-I detectáveis; porém, casos novos de hanseníase têm sido detectados nesses grupos soronegativos^{4,5,6}.

A PCR em amostras clínicas, para amplificação e sequenciamento do DNA específico do *M. leprae*, tais como biópsia de pele, linfa, sangue, bulbos capilares e secreção nasal, é uma técnica molecular mais recente que, embora demonstre a transmissão do bacilo e apresente melhor sensibilidade para o diagnóstico da hanseníase, comparada aos métodos imunológicos e/ou métodos tradicionais, como a baciloscopia do esfregaço dérmico e/ou o histopatológico de lesões cutâneas, ainda não é 100% sensível para o diagnóstico. Além disso, a amplificação do DNA bacteriano, em amostras de swab nasal, pode representar infecção temporária pelo bacilo de Hansen em indivíduos clinicamente sadios e não diferenciar DNA de bactérias vivas ou mortas^{23,24}.

Outros estudos demonstraram que contatos domiciliares, os vizinhos e contatos sociais de pacientes com hanseníase apresentam maior risco de adoecerem e podem representar a maior fonte de disseminação do bacilo, especialmente em áreas endêmicas, nas quais ocorre um nível de exposição elevado^{24,25}. Existe também a possibilidade de transmissão subclínica desses portadores temporários do bacilo para outras pessoas, a qual pode ser

verificada através da detecção e sequenciamento do DNA do *M. leprae*²⁴.

Análises têm sido realizadas para demonstrar a relação do componente genético com a hanseníase e suas formas clínicas, sugerindo que a constituição genética do hospedeiro, somada a outros fatores, inclusive referentes ao agente etiológico, têm grande importância na definição de suscetibilidade ou proteção à doença²⁶.

A teoria relacionada à genética e suscetibilidade para hanseníase admite que há uma incapacidade dos macrófagos destruírem o bacilo de Hansen, e essa característica pode ser influenciada por polimorfismos genéticos e, ainda, que determinados genes podem modificar a suscetibilidade à hanseníase e às diferentes formas clínicas²⁶.

A quimioprofilaxia ou a imunoprofilaxia são instrumentos que podem ser utilizados com o objetivo de reduzir a transmissão da hanseníase nos países endêmicos. A eficácia da quimioprofilaxia com rifampicina 600 mg (dois comprimidos de 300 mg) em dose única foi demonstrada no estudo de Moet et al²⁷, realizado em Bangladesh, o qual mostrou que uma única dose de rifampicina reduz a incidência da hanseníase nos primeiros anos em 60%, sendo que o efeito é mantido após quatro a seis anos^{27,28,29}.

Uma estratégia, que foi aplicada em Cuba por volta do ano de 1989, a quimioprofilaxia para contatos de pacientes com hanseníase, apresentando aumento de 10 vezes nos níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I, de um ano para outro, recentemente se transformou em um projeto, desenvolvido desde 2013, inclusive no Brasil, pela Fundação Novartis em colaboração com a Netherlands Leprosy Relief e outros membros da International Federation of Anti-Leprosy Associations (ILEP), denominado LPEP (*Leprosy Post-Exposure Prophylaxis*) ou somente PEP (*Post-Exposure Prophylaxis*), abordando a profilaxia pós-exposição, o qual consiste em administrar dose única do esquema ROM (rifampicina, ofloxacina e minociclina) e uma dose de vacina BCG aos contatos de pacientes com hanseníase que apresentam teste anti-PGL-I positivo^{28,29}.

A Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias (CONITEC) no Sistema Único de Saúde (SUS), do Ministério da Saúde, foi criada pela Lei n° 12.401, de 28 de abril de 2011, e dispõe sobre a assistência terapêutica e a incorporação de tecnologias em saúde no âmbito do SUS. Além disso, o Decreto n° 7.646, de 22 de novembro de 2011, regulamentou a composição, as competências e o funcionamento da CONITEC, composta por dois fóruns: Plenário e Secretaria Executiva. Dessa forma, foi instituída, na rotina dos serviços de saúde no Brasil, a quimioprofilaxia e/ou imunoprofilaxia, chamada PEP, com objetivo de ampliar a cobertura dos exames de contatos intradomiciliares, de vizinhança e sociais ou comunitários de áreas territoriais de alto risco de transmissão da doença²⁹.

Assim, os membros da CONITEC, em 11 de junho de 2015, recomendaram a incorporação da quimioprofilaxia de contatos de doentes com hanseníase, a qual consiste de uma única dose de rifampicina 600 mg que deverá ser administrada no segundo mês de tratamento do caso índice. Em crianças acima de 5 anos de idade, a prescrição é 450 mg de rifampicina (um frasco de 150 mg/mL e uma cápsula de 300 mg), e, em crianças ou adultos com peso inferior a 30 kg, administrar rifampicina 10 a 20 mg/kg. Essa intervenção, por meio da quimioprofilaxia, foi realizada no segundo semestre de 2015 nos Estados de Pernambuco, Mato Grosso e Tocantins, os quais atendem aos critérios de elegibilidade para possibilitar o alcance do objetivo da ação²⁹.

Diante dos fatos descritos e em virtude de poucos Estados brasileiros terem sido incluídos para a realização da quimioprofilaxia, é importante que ações de vigilância em saúde, por meio dos exames clínico, sorológico e molecular, continuem sendo executadas em municípios endêmicos, para identificar áreas e população de maior risco de adoecer de hanseníase, contribuindo para a redução da doença em locais onde persistem focos de transmissão ativa da hanseníase^{27,28,29,30}.

DISCUSSÃO

A despeito de todo conhecimento científico produzido até então sobre a hanseníase, essa endemia ainda persiste como problema de saúde pública nos países endêmicos, nos quais se observam áreas de transmissão ativa da doença e, mais recentemente, aumento de casos em menores de 15 anos de idade, atual indicador da magnitude do problema^{2,3}.

Instrumentos de diagnósticos na área clínica, epidemiológica, bacteriológica, histológica e genética têm sido estudados com o objetivo primordial de reduzir erros de diagnose, delimitar áreas de transmissão ativa da hanseníase e grupos com maior risco de adoecimento, além de aplicar tais instrumentos em estudos epidemiológicos com potencial para esse fim^{6,8,9,10,15,29,30,31}.

Os testes que utilizam imunocromatografia de leitura rápida, como o teste ML Flow^{4,5,6}, ou, mais recentemente, um produzido pela parceria da empresa Orange Life com o Infectious Disease Research Institute (IDRI), instituto de referência localizado em Seattle nos EUA, que desenvolve e disponibiliza antígenos, utilizando o antígeno dissacarídeo (ND-O) associado com uma proteína recombinante específica do *M. leprae*, a LID-1 (associação das proteínas ML0405 e ML2331), apresentam, segundo avaliações de trabalhos científicos, a mesma limitação para o diagnóstico dos pacientes PB³²; embora o antígeno dissacarídeo apresente melhor desempenho no diagnóstico da hanseníase PB comparado ao antígeno trissacarídeo^{9,15}.

A vigilância de contatos ou de indivíduos provenientes de regiões endêmicas, possíveis portadores do *M. leprae* em baixas concentrações, é de extrema importância, pois a contínua exposição pode resultar

em aumento do risco de infecção causada pela invasão ativa por bacilos ou por entrada passiva, decorrente de uma lacuna no epitélio da pele ou mucosa nasal após um trauma físico. Adicionalmente, mais pesquisas são necessárias para confirmar se o DNA amplificado pela PCR de pacientes ou de contatos é realmente do *M. leprae*, em secreção nasal de pacientes e indivíduos saudáveis, em uma área endêmica. Essa técnica permite o monitoramento do *M. leprae* em baixas concentrações e é relevante para detectar portadores assintomáticos, como ferramenta auxiliar para o diagnóstico da doença, evitando a utilização de outros métodos diagnósticos invasivos que elucidem do sítio de exposição ao bacilo e a possível rota de entrada do bacilo em humanos. Esses estudos complementarizam outros sobre a transmissão da hanseníase e os fatores de risco para familiares intra e extradomiciliares^{33,34}.

As citocinas são proteínas chaves na regulação da resposta imune na hanseníase. Pesquisas sugerem que a produção de citocinas no hospedeiro é geneticamente determinada. Estudos em indivíduos saudáveis têm demonstrado diferenças estáveis na produção de citocinas e têm relacionado essas diferenças com variações herdadas nos genes que codificam as citocinas. Os SNPs (polimorfismos de nucleotídeos únicos) nos genes de citocinas são estáveis, transportados por mais de 1% da população e responsáveis por afetar a produção da proteína. Devido às citocinas não serem expressas espontaneamente e terem de ser sintetizadas em resposta a algum estresse celular, como patógenos, os SNPs, na região promotora de citocinas, podem ter consequências. Dessa forma, a variabilidade genética de citocinas subjaz à complexidade de diferenças interindividuais na resposta imune a patógenos, sendo as diferenças étnicas na distribuição de diversos polimorfismos dos genes que codificam citocinas um importante fator na determinação da associação gene-doença³⁵.

A quimioprofilaxia pós-exposição, com o esquema dose única ROM ou com rifampicina de dose única, é uma estratégia que demonstrou uma redução na incidência da hanseníase em 57% ou 60% após quatro anos de seguimento; mas é uma estratégia que também possui limitações operacionais e seu efeito, a longo prazo, ainda não foi avaliado, podendo ter consequências inesperadas e não pode ser aplicado de forma constante, pois poderia gerar resistência à rifampicina^{26,28,29}.

Dessa forma, observando, no Estado do Pará, as enormes limitações, como extensão territorial, grandes distâncias, questões políticas e econômicas que, de certa maneira, dificultam o controle ou a redução da hanseníase, parece ser relevante a proposição de um teste diagnóstico simples, de fácil execução, que possa apoiar a rede de Serviços de Saúde a identificar indivíduos com risco elevado de adoecer por hanseníase. A vigilância epidemiológica e ações em saúde pública são, na verdade, pilares para que se possa vislumbrar a redução da hanseníase dentro da nossa realidade local^{2,6,8,9,15}.

Assim sendo, uma das perspectivas futuras, dentro das ações do Programa de Hanseníase do IEC, será obter parceria para transferência de tecnologia, na otimização, produção e análise de um teste rápido com base em imunocromatografia que utilize dois antígenos semissintéticos mesclados na mesma tira de nitrocelulose com os isotipos IgM, IgA e IgG, pois estudos prévios mostraram que os níveis de anticorpos IgM anti-PGL-I apresentam-se mais elevados ao se utilizar os antígenos mesclados; resta saber se a sensibilidade geral ou específica para pacientes classificados como PB será melhor com o referido teste^{6,9,15}.

É válido ressaltar que, depois de 18 anos do treinamento para implantação da técnica ELISA anti-PGL-I no Laboratório de Hanseníase do IEC, o mesmo será inserido no Gerenciador de Ambiente Laboratorial, um programa nacional do

DATASUS, Ministério da Saúde, que gerencia exames diagnósticos.

CONCLUSÃO

A pesquisa em saúde pública deveria ter uma relação estreita com os serviços de saúde, os quais estão à frente dos desafios de lidar com as diversas doenças endêmicas presentes na nossa região. É um desafio o objetivo de reduzir a prevalência de doenças endêmicas na Amazônia, já que fazemos parte de uma Instituição que deve investir nas ações de prevenção e vigilância das doenças tropicais. As perspectivas do Laboratório de Hanseníase do IEC é justamente buscar e otimizar a inovação tecnológica sustentável e aplicável aos serviços de saúde, para a minimização da hanseníase no Estado do Pará, acreditando ser essa a maior missão de uma instituição de pesquisa com foco em saúde pública.



REFERÊNCIAS

- 1 Blok DJ, De Vlas SJ, Richardus JH. Global elimination of leprosy by 2020: are we on track? *Parasit Vectors*. 2015 Oct;8:548.
- 2 World Health Organization. Global leprosy update, 2013: reducing disease burden. *Wkly Epidemiol Rec*. 2014 Sep;89(36):389-400.
- 3 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil – análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. *Bol Epidemiol*. 2013;44(11):1-12.
- 4 Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Incoen CWV, Klatser PR. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Feb;58(2):133-6.
- 5 Bührer-Sékula S, Sarno EN, Oskam L, Koop S, Wichers I, Nery JAC, et al. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000 Dec;68(4):456-63.
- 6 Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol*. 2003 May;41(5):1991-5.
- 7 Amador MPSC. Treinamento em imunohistoquímica no Hospital Público de Viena – Áustria, Departamento de dermatologia experimental: relatório técnico. Ananindeua (PA): Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Instituto Evandro Chagas; 2004 jun. 20 p.
- 8 Cunha MHCM, Silvestre MPSA, Queiroz MFA, Xavier MB. Perfil de anticorpos anti-PGL-I em indivíduos sadios de áreas endêmicas para a hanseníase do Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2012 set;3(3):41-7.
- 9 Silvestre MPSA, Araújo AB, Barreto GF. Sensibilidade do teste ELISA anti-PGL-I com dois antígenos sintéticos derivados do PGL-I do *Mycobacterium leprae*. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2012 dez;3(4):9-16.
- 10 Silvestre MPSA, Lima LNGC, Araújo AB, Quaresma JAS. Polimorfismo do gene humano *NRAMP1*, níveis de anticorpos anti-PGL-I e suscetibilidade para hanseníase em áreas endêmicas do Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2012 dez;3(4):17-26.
- 11 Lima LNGC, Lopes ML, Silvestre MPSA, Ramos FLP, Matos HJ. The presence of *Mycobacterium leprae* in sputum of respiratory symptomatic patient with multibacillary leprosy. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016 Jun;7(2):75-8.
- 12 Buu NT, Cellier M, Gros P, Schurr E. Identification of a highly polymorphic length variant in the 3'UTR of *NRAMP1*. *Immunogenetics*. 1995 Sep;42(5):428-9.
- 13 Scalercio SRRA, Amador MPSC. Polimorfismo do gene humano *NRAMP1* na suscetibilidade para hanseníase em doentes e contatos do estado do Pará. In: Resumos do 13º Seminário Interno do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Evandro Chagas-PIBIC/IEC; 2008 jul 2-4; Ananindeua, Brasil. Ananindeua (PA): IEC; 2008. p. 29.

- 14 Araújo AB, Barreto G, Amador MPSC. Avaliação dos níveis de anticorpos anti-PGL-I em amostras de soro e saliva em doentes hansênicos e seus contatos de área endêmica do estado do Pará. In: Resumos do 16º Seminário Interno do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Instituto Evandro Chagas-PIBIC/IEC; 2011 ago 24-26; Ananindeua, Brasil. Ananindeua (PA): IEC; 2011. p. 41.
- 15 Silvestre MPSA. Análise preliminar do uso mesclado de neoglicolípídeos derivados do PGL-I do *Mycobacterium leprae*: antígeno dissacarídeo (ND-O-BSA) e trissacarídeo (NT-P-BSA) como forma de aumentar a sensibilidade do teste ELISA anti-PGL-I. Rev Pan-Amaz Saude. 2012 set;3(3):33-9.
- 16 Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. J Bacteriol. 1981 Sep;147(3):728-35.
- 17 Opromolla DVA, editor. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato"; 2000. 6 p.
- 18 Payne SN, Draper P, Rees RJ. Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1982 Jun;50(2):220-1.
- 19 Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41 supl 2:11-8.
- 20 Andrade ARC, Grossi MAF, Bühner-Sékula S, Antunes CMF. Soroprevalência do teste ML Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41 supl 2:56-9.
- 21 Douglas JT, Cellona RV, Fajardo Jr TT, Abalos RM, Balagon MVF, Klatser PR. Prospective study of serological conversion as a risk factor for development of leprosy among household contacts. Clin Vaccine Immunol. 2004 Sep;11(5):897-900.
- 22 Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo Jr TT, Balagon MVF, Abalos RM, et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. Clin Vaccine Immunol. 2001 Jan;8(1):138-42.
- 23 Teixeira MAG, Silva NL, Ramos AL, Hatagima A, Magalhães V. Polimorfismos do gene *NRAMP1* em indivíduos com reações hansênicas, atendidos em dois Centros de Referência no Recife, nordeste do Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 mai-jun;42(3):281-6.
- 24 Pattyn SR, Ursi D, Ieven M, Grillone S, Raes V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1993 Sep;61(3):389-93.
- 25 Amaral LC, Goulart IMB, Araújo S, Reis EM, Goulart LR. Aplicação da PCR para investigação da infecção pelo *Mycobacterium leprae* em amostras de sangue de pacientes e seus contatos domiciliares. Horizonte Cient. 2008 out;2(1):1-35.
- 26 Novartis Foundation. A new strategy to interrupt transmission of leprosy [Internet]. Basel: Novartis Foundation; 2013 [cited 2016 Apr 27]. Available from: www.novartisfoundation.org.
- 27 Moet FJ, Pahan D, Oskam L, Richardus JH. Effectiveness of single dose rifampicin in preventing leprosy in close contacts of patients with newly diagnosed leprosy: cluster randomised controlled trial. BMJ. 2008 Apr;336(7647):761-4.
- 28 Prevedello FC, Mira MT. Hanseníase: uma doença genética? An Bras Dermatol. 2007 set-out;82(5):451-9.
- 29 Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias do SUS. Quimioprofilaxia de contatos de doentes de hanseníase com rifampicina em dose única. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. (Medicamento: Relatório de recomendação; n. 65).
- 30 Martins ACC, Miranda A, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid I antigen. Braz J Otorhinolaryngol. 2010 Sep-Oct;76(5):579-87.
- 31 Ji B. Chemotherapy and chemoprophylaxis of leprosy. In: Report of the Scientific Working Group on Leprosy. Geneva: WHO; 2002. p. 28-34.
- 32 Souza VNB. Desafios para o diagnóstico laboratorial da hanseníase. Hansen Int. 2011;36(2):5-6.
- 33 Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Romero-Montoya IM, Meléndez E, Torres F, Sakamuri RM, et al. Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia. Lepr Rev. 2009 Sep;80(3):316-21.
- 34 Lima LNGC, Frota CC, Mota RMS, Almeida RLF, Pontes MAA, Gonçalves HS, et al. Widespread nasal carriage of *Mycobacterium leprae* among a healthy population in a hyperendemic region of northeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Nov;110(7):898-905.
- 35 Lima LNGC, Frota CC, Freitas MVC, Câmara LMC, Rodrigues LC, Barreto ML, et al. Cytokine polymorphisms and susceptibility to leprosy. Rev Bras Med. 2013 Oct;70(10):1-5.