

ESTUDO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE ELISA ANTI PGL-1 NO ESTADO DE SÃO DE SÃO PAULO

Mitie Tada L.R.F. Brasil¹
 Luiz Roberto de Oliveira²
 Carmem Silva de Mello³
 Paulo Mutuko Nakamura³
 Marli P. Manini⁴
 Denise Steiner⁵
 Osmar Rotta⁶

RESUMO - Os testes sorológicos para diagnóstico de hanseníase, usando o glicolípídeo-fenólico, considerado antígeno específico do *M. leprae* têm aberto algumas possibilidades de estudo do comportamento epidemiológico desta doença. Foi realizado um estudo para medir a sensibilidade e especificidade de um teste de ELISA anti PGL-1, usando material e técnica proveniente de Cuba (UMELISA). Foram testados 84 doentes e 112 controles sadios.

A sensibilidade do teste foi maior para o grupo de doentes multibacilares, sendo mais alto entre os casos classificados como virchowianos (V), seguido dos dimorfos (D). No grupo de multibacilares, considerando o limiar de reatividade de 0,200, observou-se que apenas 75,0% de pacientes V e 50,0% de D foram positivos ao teste e, no limiar de 0,300, apenas 64,3% dos V e 40,0% dos D ainda mostravam positividade. Os doentes indeterminados apresentaram maior proporção de soropositivos do que os tuberculóides e isto talvez traduza a polarização de alguns casos para formas multibacilares. A especificidade do teste foi de 87,5% no limiar de 0,200 e de 99,1% no de 0,300. Este teste, à semelhança de outros, apresentou alta especificidade e baixa sensibilidade, resultando em grande percentual de falso-negativos.

Para uma doença em que os testes sorológicos são escassos, apesar de não se recomendar o uso indiscriminado do teste para triagem de casos na população geral, a continuidade de seu aprimoramento tecnológico deve ser estimulada. Conseguir-se-ia, assim, avançar na pesquisa de instrumentos cada vez mais sensíveis e específicos para melhorar o diagnóstico precoce e, desse modo intervir mais oportunamente na cadeia de transmissão.

Palavras-chaves: Hanseníase, ELISA, Glicolípídeo fenólico-1-PGL-1

¹Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. A . Vranjac - SES-SP

²Departamento de Saúde Pública- Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP -

³Instituto Adolfo Lutz- SES-SP

⁴Divisão de Dermatologia Sanitária - SES- SP

⁵Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Jundiaí - SP

⁶Departamento de Dermatologia da Escola Paulista de Medicina - UNIFESP - SP

1. INTRODUÇÃO

A hanseníase é doença infecciosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que acomete principalmente pele e nervos causando sérias incapacidades físicas. Devido à sua magnitude e transcendência é considerada problema de saúde pública no Brasil e, portanto, objeto de programa de controle específico.

As ações se baseiam na descoberta de casos, no tratamento de todos os casos detectados com poliquimioterapia, na vigilância e vacinação com BCG-ID dos contatos intra-domiciliares e nas atividades de educação em saúde. Estas medidas, portanto, dependem fundamentalmente de serviços de saúde razoavelmente organizados. O impacto destas ações sobre a endemia se faz de forma lenta, mesmo que bem planejadas e executadas. Acredita-se que o controle seria otimizado se houvesse a possibilidade do diagnóstico mais precoce e tratamento de todos os casos, impedindo que evoluíssem para as formas multibacilares. Desta forma, poder-se-ia conseguir a quebra da transmissão da doença na comunidade.

O estudo da infecção subclínica é importante para a compreensão da história natural da hanseníase e a possibilidade de identificar adequadamente nos indivíduos expostos, aqueles com risco de adoecer, o que poderia trazer importante contribuição para o controle da transmissão.

A caracterização dos componentes antigênicos específicos do *M. leprae* (CALDWELL et al, 1979; ABE et al., 1980; HARBOE et al., 1978) e o isolamento do PGL-1 (HUNTER & BRENNAN, 1981; BRENNAN & BARROW, 1981; HUNTER et al., 1982) levou à produção dos testes laboratoriais, como o ELISA e a aglutinação, para dosar anticorpos anti *M. leprae* disponíveis comercialmente (BRETT et al., 1983).

Não se observaram respostas cruzadas com outras doenças (PAYNE et al., 1982; CHO et al., 1983) como tuberculose ou outras micobacterioses atípicas, mostrando boa especificidade. Os testes, em geral, foram mais sensí-

veis para o grupo de doentes multibacilares do que paucibacilares (YOUNG et al., 1985). O tempo de tratamento dos casos virchowianos mostrou queda na positividade ao teste (CHO et al., 1983; BACH, et al., 1986; REPA, et al., 1991), sugerindo que a sorologia poderia ter utilidade para monitorar tratamento.

O PGL-1 parece estimular basicamente o anticorpo IgM (YOUNG et al., 1984; FUJIWARA et al., 1984) e a presença deste anticorpo tem sido atribuído à infecção persistente (TOUW, 1982). BUCHANAN et al. (1983), em um artigo de revisão, observam que a utilidade de qualquer teste sorológico está na capacidade preditiva de apontar o indivíduo que desenvolverá a doença.

Um estudo comparativo efetuado pela OMS em 8 laboratórios de referência (Estados Unidos, Venezuela, Sri Lanka, Suíça e Londres) com vários tipos de teste de ELISA e usando antígenos naturais e sintéticos. Observou-se alta concordância entre os laboratórios e entre os procedimentos (87,0%) (LANCET, 1986). Resultados similares foram observados em outros trabalhos (DOUGLAS, STEVEN, HIRSH, 1992), que comparam 4 antígenos semi-sintéticos em populações sadias de áreas endêmicas e não-endêmicas e a especificidade foi alta nas duas populações estudadas. Alguns autores justificam o uso do teste de ELISA anti PGL-1 para diagnóstico de infecção subclínica, apesar do risco de adoecer da população sadia soropositiva não estar ainda estabelecida (DAVID et al, 1992) e outros consideram que, em teoria, altos títulos de anticorpos específicos, se interpretados como forte resposta humoral, possam refletir tanto infecção pelo *M. leprae*, como desenvolvimento de doença multibacilar (FINE et al., 1989).

ABREU-CASTELLS et al., em 1989, analisaram a comprovação sorológica da atividade de um antígeno do *M. leprae* obtido por síntese química em Cuba por MARINO e VEREZ, que o consideraram similar aos sintetizados por outros pesquisadores. A sensibilidade do antígeno cubano foi de 71,0% e a do antígeno referência foi de 66,0%. A especificidade, respectivamente, foi de 89,0% e 94,0%.

Em Ribeirão Preto, estado de São Paulo, foram realizados estudos com teste de ELISA anti PGL-1 em 402 indivíduos, sendo que 47 eram doentes de hanseníase, 12 de tuberculose, 19 eram contatos de casos de hanseníase e 324 amostras de doadores de sangue sadios. Encontrou-se que os títulos eram normais em doentes da forma tuberculóide e "borderline", nos casos de tuberculose e nos contatos de hanseníase. Encontrou-se que 3,8% dos doadores foram soropositivos (10 casos) e 19,4% tinham níveis suspeitos (63 casos). Dos 10 sadios soropositivos submetidos ao teste de Mitsuda, 3 foram negativos. Os autores consideram que, em vista destes resultados, o ELISA parece ser um importante teste para detecção e profilaxia das formas subclínicas (FOSS, CALLERA & ALBERTO, 1993).

Considerando os resultados observados pelos diferentes estudos e a situação da endemia hanseníaca no estado de São Paulo, um estudo coordenado pelo Centro de Vigilância Epidemiológica, propôs-se avaliar a aplicabilidade desta ferramenta em comunidade de alta prevalência e detecção, objetivando aprimorar as atividades do controle. Este artigo em particular, focaliza a primeira etapa deste projeto de pesquisa e permitiu a definição da sensibilidade e especificidade do teste ELISA anti PGL-1 e o processo adotado para determinar o limiar de reatividade do teste utilizado nas etapas subsequentes do estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Detecção de anticorpo IgM anti PGL-1

Foram analisadas amostras de soro de 28 doentes virchowianos, 20 dimorfos, 22 tuberculóides e 14 indeterminados e 112 soros de indivíduos sadios.

Os soros de doentes (controle positivo) foram obtidos no Centro de Referência de Hanseníase da Grande São Paulo e os soros de não-doentes da hanseníase (controle negativo) foram obtidos no Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar do Juqueri, que assiste

doentes mentais isolados há mais de 10 anos e que residiam em pavilhões sem casos de hanseníase neste intervalo de tempo (estas amostras faziam parte da coleta para exames de rotina). Os controles negativos foram examinados para hanseníase pelo Serviço de Dermatologia do hospital.

Foram calculadas as diferentes sensibilidades do teste no grupo de doentes, bem como as diferentes especificidades no grupo de não-doentes. Como não existe teste padrão-ouro para hanseníase, a clínica foi usada para comparação do controle positivo.

A análise laboratorial das amostras de soro foi executada, usando técnica de ELISA desenvolvida pelo Instituto de Medicina Tropical, Cuba, denominado Sistema de Ultramicroanálise (SUMA), de acordo com a metodologia descrita por LAFERTE et al. (1991) onde se pode encontrar todos os procedimentos técnicos detalhados. Este teste detecta a presença de anticorpos da classe IgM usando um dissacárido semi-sintético acoplado a uma proteína.

O critério de soropositividade recomendada por LAFERTE et al. (1991) foi determinado previamente sobre uma população sadia de Cuba sem contato conhecido com a hanseníase, utilizando o critério de percentil 98 recomendado pela OMS. Os resultados obtidos com os 433 soros testados, indicaram que 0,135 seria o limiar de reatividade mais adequado para aquela situação estudada.

No estudo realizado em São Paulo, para definição do limiar de reatividade mais adequado foram calculados a sensibilidade e especificidade em vários níveis de reatividade e usou-se, também, a técnica de Receiver Operating Characteristics Curves (ROC analysis - FEINSTEIN,1985).

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos na realização dos testes usando o grupo controle positivo e o grupo controle negativo estão no Quadro 1 e 2 e no Gráfico 1 e 2.

Quadro 1 - Sensibilidade do ELISA anti-PGL-1 - São Paulo -1989

| Limiar de reatividade | Formas clínicas | | | | |
|-----------------------|-----------------|-------|-------|-------|--------------|
| | V | D | T | I | Todas formas |
| 0,050 | 96,4% | 85,0% | 68,2% | 71,4% | 82,1% |
| 0,150 | 82,1% | 60,0% | 54,5% | 57,1% | 65,5% |
| 0,200 | 75,0% | 50,0% | 18,2% | 57,1% | 51,2% |
| 0,250 | 67,9% | 45,0% | 18,2% | 57,1% | 47,6% |
| 0,300 | 64,3% | 40,0% | 18,2% | 57,1% | 45,2% |
| 0,500 | 57,1% | 25,0% | 9,1% | 14,3% | 29,8% |

Quadro 2 - Especificidade do teste ELISA anti PGL-1, grupo controle-negativo - São Paulo - 1989.

| Limiar de reatividade | Controle negativo |
|-----------------------|-------------------|
| 0,050 | 28,6% |
| 0,150 | 73,2% |
| 0,200 | 87,5% |
| 0,250 | 91,9% |
| 0,300 | 99,1% |
| 0,500 | 100,0% |

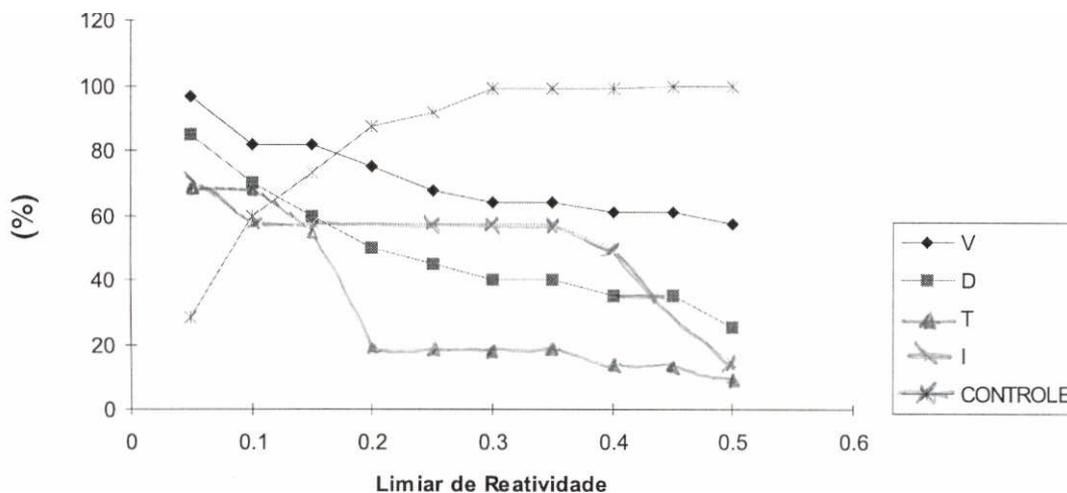
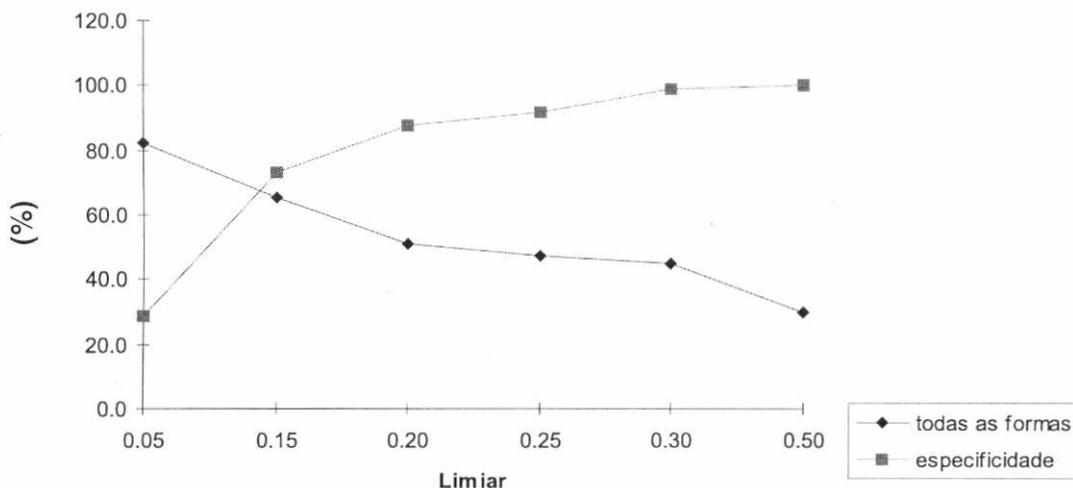
Conforme se observa no Quadro 1 e no Gráfico 1, a sensibilidade do teste para todas as formas clínicas decresce de 82% para 51% ao se passar do limiar 0,050 para 0,200; a partir deste ponto, continua caindo mais suavemente até 30%, no limiar 0,500. Observa-se, também, que a sensibilidade varia com as formas clínicas, sendo mais elevada na virchowiana (V) e menor na tuberculóide (T). As formas dimorfas (D) e a indeterminada (I) tem sensibilidade próximas entre si e intermediárias entre as formas V e T,

comportando-se, em relação aos limiares de reatividade, mais como forma V, ou seja, com razoável estabilidade na faixa situada entre 0,150 e 0,300; isso não ocorre com a forma T, que na mesma faixa de reatividade, apresenta acentuada queda da sensibilidade, que vai situar-se em 18%.

A especificidade do teste, por sua vez, tem comportamento inverso ao da sensibilidade, apresentando expressiva elevação na faixa de reatividade de 0,050 a 0,300, passando de 28 para 99%. Acima de 0,300 é praticamente de 100% (Quadro 2).

O Gráfico 1 mostra que a sensibilidade do teste é maior nos doentes virchowianos em todos os limiares de reatividade e que nos doentes tuberculóides foi bem menor. Nos grupos de indeterminados e dimorfos a sensibilidade apresentou valores intermediários, sendo que nos indeterminados o declínio da curva se faz de forma menos acentuada do que nos dimorfos.

O mesmo Gráfico 1 mostra que, a partir do limiar de reatividade 0,300, a especificidade está próxima de 100,0%. No limiar de 0,150 a sensibilidade, com exceção dos virchowianos, permanece praticamente inalterada, mas a especificidade cai, passando a incorporar mais de 10,0% de falso-positivos.

Gráfico 1. Sensibilidade (todas as formas) e especificidade do teste ELISA anti PGL-1. São Paulo - 1989**Gráfico 2 -** Sensibilidade e especificidade do ELISA anti PGL-1 - São Paulo - 1989.

Como se pode verificar, a sensibilidade e a especificidade tem comportamento antagônico, sendo que ao aumentar substancialmente a sensibilidade a especificidade tende a diminuir em igual proporção.

A técnica de ROC Analysis indica que o limiar de reatividade razoável estaria em torno de 0,250. Neste ponto, a especificidade do teste, é baixa, comportando a ocorrência

de 8% de falso-positivos. No entanto, um pouco acima deste limiar, na reatividade 0,300, a especificidade toma-se 99%, sendo mais adequada para a finalidade do teste que se propõe neste estudo.

Soros de pacientes com tuberculose, sífilis e gestantes, analisados nesta fase do estudo, apresentaram-se não-reagentes para o limiar de 0,300.

4. DISCUSSÃO

A descoberta de antígenos específicos do *M. leprae* e a obtenção por síntese química de grandes quantidades acenou com possibilidades interessantes de estudos populacionais. Os primeiros estudos com o PGL-1 foram para se determinar a sensibilidade do teste. Usou-se, basicamente, os casos clinicamente comprovados como controle-positivos e amostras de sangue de população de áreas não-endêmicas ou mesmo grupos considerados não-doentes da própria região, como controle-negativos. Todos os estudos mostraram que a sensibilidade do ELISA era maior no grupo de doentes multibacilares do que no de paucibacilares. O teste era específico para hanseníase, não se observando respostas cruzadas com tuberculose ou outras micobacterioses. Isto criou muita expectativa de seu uso em massa para a detecção de casos subclínicos e a possibilidade de quimio-profilaxia, desta forma negatizando futuras fontes de infecção.

A sensibilidade do teste de ELISA observado neste trabalho, à semelhança dos outros, mostrou que as formas multibacilares, principalmente os virchowianos, apresentam maior percentual de soropositivos em qualquer limiar de reatividade estudado. Entre os indeterminados, observa-se que a proporção de soropositivos é maior do que entre os tuberculóides, talvez porque entre esses casos estivessem os no limite da polarização para multibacilar.

A classificação de Madri, usada neste trabalho, engloba diferentes situações dentro do espectro clínico quando se trata de doentes do grupo indeterminado ou dimorfo, o que pode explicar em parte as taxas de sensibilidade encontradas.

Pelo Quadro 2 e Gráfico 1 observa-se que a especificidade é boa, sendo que acima do limiar de 0,250 a especificidade é maior do que 91,9%. Se o objetivo é estudar a infecção subclínica e a sua associação com o aparecimento da doença, esta característica é bastante desejável. Neste limiar de 0,250 a sensibilidade do teste para detectar os virchowianos é de 67,9%, para os dimorfos é de 45,0%, para os tuberculóides é de 18,2% e

para os indeterminados é de 57,1 %.

Se o que interessa identificar com o teste ELISA - anti PGL-1 são as pessoas infectadas em fase subclínica, isso se consegue com a especificidade próxima de 100%, ou seja, com limiar de reatividade de 0,300. Nestas condições o teste, embora descarte mais da metade de todas as formas clínicas (54,8% de falso-negativos), não deve incluir nenhum falso-positivo. Entre os soropositivos estarão, com elevada probabilidade, apenas indivíduos infectados, doentes ou em fase subclínica (COPELAND, 1977; KRONVALL, 1981). Espera-se que o teste, nestas condições, aplicado em populações de risco, identifique também pessoas infectadas em fase subclínica com grande segurança para, se for o caso, serem submetidas às ações de controle cabíveis.

Os outros estudos que avaliaram a sensibilidade e especificidade do teste de ELISA com PGL-1 encontraram sensibilidades maiores do que o encontrado no presente trabalho, como CHO *et al.* (1983), com 88% de positividade para os casos V, BRETT *et al.* (1986), que observaram 96% de positivos nos doentes V, BACH *et al.* (1986) com 80% de soropositividade nos casos não tratados, BURGESS *et al.* (1988) com 96% de positividade nos multibacilares. Estes diferentes resultados podem ser explicados pela diversidade metodológica: diferentes populações estudadas, pequenas diferenças entre os antígenos (dissacárido, trissacárido, natural ou sintético). Apesar das diferenças quanto à sensibilidade dos testes, todos os estudos reproduziram o mesmo comportamento frente às diferentes formas clínicas. Todos eram mais sensíveis para as formas multibacilares do que para paucibacilares. Quanto à especificidade, foi bastante alta em todos os estudos.

ABREU-CASTELLS *et al.*, (1989) usando o mesmo antígeno deste estudo, o dissacárido-acrilamida, definiram a sensibilidade em 71% para os multibacilares, considerando a média de reatividade mais um desvio-padrão (0,417 + 0,424). SAAD *et al.* no estudo realizado pela Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), encontraram alta sensibilidade nos

casos virchowianos (83,3%) e baixa positividade entre os tuberculóides. Portanto, neste estudo a sensibilidade pode ser considerada realmente muito baixa para todas as formas clínicas e a utilização do teste implica 54,6% de falso-negativos, ou seja, de casos que não seriam detectados por este método. A perda de casos é maior para os tuberculóides, pois 81,8% não seriam detectados por este método.

Os casos PB apresentam resposta imunológica do tipo celular e, na maioria dos casos não apresentam anticorpos circulantes ou, se apresentam, fazem-no em quantidades pequenas (YAMASHITA *et al.*, 1992), explicando, desse modo, o grande percentual de negativos. Poder-se-ia esperar maior sensibilidade do teste para a detecção dos multibacilares, principalmente dos virchowianos, cuja resposta imunológica é basicamente humoral, já que o mesmo dosa anticorpos. A baixa sensibilidade pode ser devida à formação de imunocomplexos, inibindo a reação em alguns casos.

Ao ser considerada uma maior especificidade do teste, ou seja, uma menor chance de reação cruzada, há a indicação de que se trata de infecção específica pelo agente estudado, podendo os indivíduos sadios que apresentarem respostas positivas ao teste ser considerados como portadores de infecção inaparente antiga ou atual. No caso da

hanseníase e do PGL-1, por se tratar de antígeno que estimula principalmente IgM (DOUGLAS *et al.*, 1984), nos doentes que apresentam estímulo contínuo pode ser dosado mesmo após 20 anos de doença. No caso de indivíduos sadios expostos ao *M. leprae* que apresentam sorologia positiva anti PGL-1 pode-se inferir que estejam infectados (MENZEL *et al.*, 1987), podendo ou não desenvolver a doença, dependendo de como seu organismo reage a esta infecção (FINE, 1982). Caso a soropositividade possa ser traduzida como infecção subclínica, quais os fatores que estariam associados a esta condição para se definir a probabilidade de adoecer de uma pessoa infectada?

Com o intuito de abordar esta e outras questões, como já anteriormente relatado, foi efetuado um estudo em área de alta prevalência e detecção de hanseníase, que será objeto de outra publicação.

Agradecimentos - Mary Lise C. Marzliak, Tanya Eloise Lafratta, Wagner Nogueira, Clóvis Lombardi, Diltor V.A. Opromolla, às equipes do Serviço de Dermatologia Sanitária e do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar do Juqueri.

Parte da tese de Mestrado, na área de Dermatologia, apresentada à Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo.

ABSTRACT - Serum tests for leprosy diagnosis, using phenol-glyco-lipid -1 considered to be a specific antigen of the *M. leprae*, has brought about some possibilities to the study of the epidemiological behavior of the disease. A study was performed to evaluate the sensibility and specificity of an ELISA anti PGL-1 test using Cuban material and techniques (UMELISA). Eighty-four patients and a control group with 112 persons were tested.

The sensibility of the test was larger for the multibacilar patients with higher levels for the cases classified as Lepromatous (L) followed by the Bordeline (B) ones. In the multibacilar group, considering a 0.200 cut-off level, it was observed that only 75.0% of the Lepromatous patients and 50.0% of the Bordeline patients tested positive. For a 0.300 cut-off level, only 64.3% of the L patients and 40.0% of the B patients still tested positive. The undetermined form patients presented a larger rate of positive results than the tuberculoid form and that may be a hint of a polarization of some cases of the multibacilar forms. The specificity of the test was 87.5% at the 0.200 cut-off level and 99.1% at 0.300. This test, as some others, presented high specificity and low sensibility, resulting a large percentage of false negative tests.

As leprosy is a disease with few serum tests, it is found that further technological development of this test should be stimulated, although its indiscriminate use for large scale screening of the general population is not recommended. This way, advances in the research of more sensitive and specific tools for early diagnosis could be reached allowing for efficient intervention on the transmission chain of the disease.

Key words: Leprosy, ELISA, phenol-glyco-lipid - PGL-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; MINAGAWA, F.; YOSHINO, Y.; et al. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA - ABS) test for detecting subclinical infection with *M. leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v. 48(2), p. 109-119, 1980.
- ABREU-CASTELLS, E.G.; SEGREDO, A.; ALBERNAS, J. M.; BENCOMO, V.V. Comprobación serológica de la actividad de un antígeno del *M. leprae* obtenido por síntesis química. *Revista cubana - Medicina Tropical*, v. 41(1), p. 10-17, 1989.
- BACH, M.A.; WALLACH, D.; FLAGEUL, B.; et al. Antibodies to Phenolic Glycolipid-1 and to whole *M. leprae* in leprosy patients: evolution during therapy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v. 54(2), p. 256-276, 1986.
- BRENNAN, P.J. & BARROW, W.W. - Evidence for species-specific lipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v. 48, p. 382-387, 1981.
- BRETT, S.J.; DRAPER, P.; PAYNE, S.N.; REES, J.W. Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from *M. leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 52, p. 271-279, 1983.
- BRETT, S.J.; PAYNE, S.N.; GIGG, J.; et al. Use of synthetic and immuno-dominant epitope of phenolic glycolipid-1 serology of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 64, p. 476-483, 1986.
- BUCHANAN, T.M.; YOUNG, D.B.; MILLER, R.A.; KHANOLKAR, S.R. Serodiagnosis of infection with *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v. 51(4), p. 524-530, 1983.
- BURGESS, P.J.; FINE, P.E.M.; PONNINGHAUS, J.M.; DRAPER, C. Serological tests in leprosy. The sensitivity, specificity and predictive value of ELISA tests based on phenolic glycolipid antigens and the implications for their use in epidemiological studies. *Epidem. Inf.*, v. 101, p. 159-171, 1988.
- CALDWELL, H.D.; KIRCHHEIMER, W.F.; BUCHANAN, T.M. Identification of a *Mycobacterium leprae* specific protein antigen(s) and its possible application for the serodiagnosis of leprosy. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v. 47(3): 477-483, 1979.
- CHO, S.; YANAGIHARA, D.L.; HUNTER, S.W.; GELBER, R.H.; BRENNAN, P.J. Serological specificity of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infectious and Immunity*, v. 41(3), p. 1077-1083, 1983.

- COPELAND, K.T.; CHECKOWAY, H.; McMICHAEL, A., J.; HOLBROOK, R.H. Bias due to misclassification in the estimation of relative risk. *Am.J. Epidem.*, v. 105(5), p. 488-495, 1977.
- DAVID, H.L.; PAPA, F.; CRUAD, P.; et al. Relationship between titers of antibodies immunoreacting against glycolipid antigens from *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis*, the Mitsuda and Mantoux reactions and bacteriological loads: implications in the pathogens, epidemiology and serodiagnosis of leprosy and tuberculosis. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v. 60 (2), p. 208-224, 1992.
- DOUGLAS, J.T.; STEVEN, L.M.; FAJARDO, T.; et al. The effects of chemo-therapy on antibody levels in lepromatous patients. *Lepr. Rev.*, v. 59, p. 127-135, 1988.
- DOUGLAS, J.T.; STEVEN, L.M.; HIRCH, D.S.; Evaluation of four semisynthetic *Mycobacterium leprae* antigens with sera from healthy population in endemic area. *Lepr. Rev.*, v. 63, p.199-210, 1992.
- FEINSTEIN, A. R. Clinical Epidemiology - part 6 - 601-609. W. B. Sanders Company. USA, 1985
- FINE, P.E.M. - Leprosy: The epidemiology of a slow bacterium. *Epidem. Rev.*, v. 4, p. 161-188, 1982.
- FOSS, N.T.; CALLERA, F.; ALBERTO, F.L. Anti PGL-1 levels in leprosy patients and their contacts. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 26, p. 43-51, 1993.
- FUJIWARA, T. HUNTER, S.W.; CHO, S.; ASPINAL, G.O.; BRENNAN, P.J. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the Leprosy bacillus and preparations of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity*, v. 43(10), p.245-252, 1984.
- HARBOE, M.; CLOSS, B.; BJUNG, G.; KRONVALL, G.; AXELSEN, N.H.- *Mycobacterium leprae* specific antibodies detected by radio immunoassay. *Scand. J. Immunol.*, v. 7, p. 11-20, 1978.
- HUNTER, S.W.; BRENNAN, P.J. A novel Phenolic Glycolipid from *Mycobacterium leprae*. Possible involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol.*, v. 147(3), p. 728-735, 1981.
- HUNTER, S.W.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P.J. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 257(24), p. 15072-15078, 1982.
- KRONVALL, G. - The potential of immunological tests as a tool in the epidemiology of leprosy. *Lepr. Rev.*, v. 52 (suppl 1), p. 207-219, 1981.
- LAFERTE, J.; ABREU, E.G.; ROBAINA, R.; VEREZA, V. Ultramicroelisa para la detección de anticuerpos IgM anti *M. leprae*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 33(6), p. 491-495, 1991.
- LANCET (Anonymous) - Serological tests for leprosy. *The Lancet*, v. 8, p. 533- 535, 1986. (Editorial)
- MENZEL, S.; HARBOE, M.; BERGSHVIK, H.; BRENNAN, P.J. - Antibodies to a synthetic analog of phenolic glycolipid-1 of *M. leprae* in the healthy household contacts of patients with leprosy. *Int. J. Lepr Other Mycobact. Dis.*, v. 55, p. 617-625, 1987.
- PAYNE, N.S.; DRAPER, P.; REES, R.J.W.- Serological activity of purified glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, v. 50(2), p. 220-221, 1982.
- REPKA, J.C.D.; BRANA, L.R.; FABRICIO, L.H.; et al. Imunologia na hanseníase - Aspectos de avaliação imunológica no tratamento. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 34(1), p. 53-60, 1991.
- SAAD, M.H.F.; MEDEIROS, M.A.; GALLO, M.E.N.; et al. IgM immunoglobulins reacting with the phenolic glycolipid-1 antigen from *M. leprae* in sera of leprosy patients and contacts. *Mem. Inst. O. Cruz*, v. 85(2):191-194, 1990.
- 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, 416-425, 1991.
- TOUW, J.; LANGNDIJK, E.M.J.; STONER, G.L.; BELIHU, A. Humoral immunity in leprosy: immunoglobulin G and M antibody responses to *Mycobacterium leprae* in relation to various disease patterns. *Infect. Immunit.*, v. 36(3), p. 885-892, 1982.
- YAMASHITA, J.T.; CRUAD, P.; ROTTA, O.; DAVID, 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(1), p.44-50, 1993.
- YOUNG, D.B.; DESSANAYAKE, S.; MILLER, R.A.; KHANOLKAR, S.; BUCHANAN, T.M. - Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 149(6), p. 870-874, 1984.
- YOUNG, D.B.; HARNISH, I.; KNIGHT, J.; BUCHANAN, T.M.- Detection of phenolic glycolipid-1 in sera from patients with lepromatous leprosy. *The Journal of Infectious diseases*, v. 152 (5), p. 1078-1081, 1985-