

---

**AVALIAÇÃO DOS ANTICORPOS SÉRICOS TOTAIS**

---

**ANTIGLICOLÍPEO FENÓLICO DE *Mycobacterium leprae***

---

**EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HANSENÍASE**

---

**E SEUS CONTATOS DOMICILIARES NO ESTADO DE GOIÁS, BRASIL**

---

*Bruna Daniella de Souza Silva, <sup>1</sup> Marise Ramos de Souza, <sup>2</sup> Thereza Liberman Kipnis <sup>3†</sup> e Ana Paula Junqueira-Kipnis <sup>2</sup>*

**RESUMO**

A hanseníase é uma doença infecciosa, de evolução crônica, cujo agente causal é o *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular obrigatório que infecta mais frequentemente macrófagos e células nervosas periféricas de Schwann. O diagnóstico da hanseníase é complexo, visto que a doença evolui para diferentes formas clínicas e histopatológicas. Novos testes diagnósticos têm sido propostos com o objetivo de identificar possíveis fontes de contágio e controlar a transmissão da doença. Dentre eles, destaca-se a dosagem de anticorpos IgM antiglicolípido fenólico (PGL-1), específico de *Mycobacterium leprae*, para vigilância de doentes e seus contatos. Neste trabalho, foram avaliados os níveis séricos de anticorpos totais antiPGL-1 em 102 indivíduos portadores de hanseníase (formas multibacilar e paucibacilar) e 65 contatos domiciliares destes indivíduos, por meio de ensaio imunoenzimático. Tanto os pacientes quanto seus contatos apresentaram níveis séricos detectáveis de anticorpos antiPGL-1, o que indica potencial risco de transmissão entre eles.

**DESCRITORES:** *Mycobacterium leprae*. ELISA. Anticorpos antiPGL-1. Portadores de hanseníase. Contatos domiciliares.

**INTRODUÇÃO**

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica que constitui um grave problema de saúde pública, uma vez que acomete cerca de 300 mil pessoas no mundo todo (OMS, 2006). É causada pelo *Mycobacterium leprae*

---

1 Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do IPTSP, UFG.

3 Universidade Estadual do Norte-Fluminense.

† Falecida.

Endereço para correspondência: Dra. Ana Paula Junqueira Kipnis, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Rua 235, esq. com 1ª Avenida, s/n, Setor Universitário, CEP 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil. E-mail: anapaula@iptsp.ufg.br

Recebido para publicação em: 17/3/2009. Revisto em: 29/6/2009. Aceito em: 28/8/2009.

(*M. leprae*) ou bacilo de Hansen (Treo, 1969), que possui capacidade de infectar grande número de indivíduos, porém poucos adoecem em virtude de sua baixa patogenicidade (MS, 1994).

As alterações de sensibilidade, pigmentação e a inflamação da pele constituem os principais sintomas, associados a lesões nos nervos periféricos (MS, 2000). Apesar de ser uma doença crônica, a hanseníase pode exibir fenômenos agudos denominados de estados reacionais (Reação Reversa e Eritema Nodoso Leproso) que ocorrem durante a poliquimioterapia (PQT) ou após o término do tratamento (Talhari & Neves, 1997; Weir et al., 1999). A hanseníase pode apresentar-se sob diferentes formas clínicas, determinadas pela resposta imunológica do paciente (Jopling & Ridley, 1966; MS, 1994). Segundo a forma clínica e histopatológica é classificada em: tuberculoide polar, borderline-tuberculoide, boderline-boderline, boderline-lepromatosa e lepromatosa polar; e, segundo o tratamento com a PQT, proposto pela OMS, em: paucibacilar (tuberculoide polar, bordeline-tuberculoide e indeterminada) e multibacilar (boderline-boderline, boderline-lepromatosa e lepromatosa polar) (Bernardi, 1981; Fleury, 1989; Patil et al., 2000; MS, 1994; Jacobson & Krahenbuhl, 1999; Ooi & Moschella, 2001).

A parede celular do *M. leprae* consiste de uma dupla membrana contendo peptidoglicanas e lipopolissacarídeos. O PGL-1 (glicolípido fenólico 1) é um componente da parede celular exclusivo do *M. leprae*, que está envolvido na interação do bacilo com a laminina (componente da matriz extracelular do hospedeiro). Vários estudos comprovam que este componente facilita a entrada e a colonização de células de Schwann. Estas células, além de serem responsáveis pela produção da bainha de mielina, atuam como apresentadoras de antígenos micobacterianos. O reconhecimento e a resposta imune induzida após a apresentação desses antígenos são os principais responsáveis pelas lesões ocorridas na hanseníase (Sehgal et al., 1977; Rambukkana, 2001; Brennan, 2000; Habib & Mozaffar, 2002).

O controle da hanseníase depende da detecção precoce da doença, o que possibilita diminuir ou eliminar a disseminação do patógeno (OMS, 2005; Meima et al., 2004). Os contatos de portadores de hanseníase são os indivíduos com maior risco de desenvolver a doença clínica (MS, 1994). No entanto, em razão da inexistência de estudos que comprovem o período de latência e da grande diversidade de formas clínicas, a identificação de contatos que irão desenvolver a doença se torna complexa (Lockwood, 2002; Lockwood & Kumar, 2004). Do mesmo modo, estudos recentes mostram que o diagnóstico clínico precoce da hanseníase em contatos de pacientes não é suficiente para impedir o desenvolvimento da doença, fato que torna necessária a utilização de outros métodos diagnósticos para acompanhá-los (Cardona-Castro et al., 2005).

Diversos trabalhos têm demonstrado que os níveis séricos de anticorpos IgM antiPGL-1 podem identificar, dentre os contatos domiciliares de pacientes com hanseníase, aqueles indivíduos com maior risco de desenvolver a doença (Stefani et al., 1998; Soares et al., 1994; Bakker et al., 2006; Cardona-Castro et al., 2008).

No entanto, não é de nosso conhecimento qualquer trabalho que haja comparado os níveis de anticorpos totais antiPGL-1 entre pacientes portadores de hanseníase e seus contatos domiciliares no estado de Goiás.

Neste trabalho avaliamos os níveis séricos de anticorpos totais antiPGL-1 em uma coorte de indivíduos portadores de hanseníase e em seus respectivos contatos domiciliares, atendidos no município de Goiânia, Goiás.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Participantes

Entre 1999 e 2001 foram recrutados 102 pacientes portadores de hanseníase e 65 respectivos contatos domiciliares, atendidos no Hospital de Doenças Tropicais (HDT) e no Centro de Referência em Diagnóstico e Terapêutica de Goiânia. Durante esse período, 88 pacientes com hanseníase multibacilar e 49 contatos domiciliares destes pacientes aceitaram participar do estudo. Foram recrutados também 14 indivíduos portadores de hanseníase paucibacilar e 16 contatos domiciliares destes pacientes.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do HDT. Após a assinatura do termo de consentimento, os participantes deste estudo responderam a um questionário socioepidemiológico e 5mL de sangue de cada participante foram coletados em tubo seco (sem anticoagulante). As amostras de soro dos pacientes e de seus contatos foram obtidas após centrifugação do sangue a 2.500 x g por 15min. Aliquotas de 500 µL foram congeladas a -20°C até o momento do uso.

Para avaliar se a presença de cicatriz vacinal para o BCG influenciava o desenvolvimento de alguma das formas clínicas, os pacientes foram estratificados de acordo com a forma clínica e a presença ou ausência de cicatriz vacinal.

### ELISA

Os poços das placas de poliestireno (NUNC-Immunoplate) foram adsorvidos com o antígeno PGL-1 (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Patrick Brennan da Universidade Estadual do Colorado - EUA) diluídos a 5,0µg/mL (50µL/poço) em etanol. As placas foram secas durante três horas no fluxo laminar e, após este período, foram embaladas com papel alumínio e congeladas a -20°C. No dia do ensaio, os poços foram bloqueados com solução de carbonato-bicarbonato contendo leite em pó desnatado a 0,1% (100µL por poço) por duas horas. Após lavagem com PBS, as alíquotas dos soros diluídos (1/400) em solução de PBS, contendo 8% de soro normal de cabra, foram adicionadas às placas e estas, incubadas por três a quatro horas. Após seis lavagens com PBS, foi adicionada a solução contendo o anti-anticorpo conjugado com peroxidase (1/6.000, anti-Ig humana total, Sourthen Bactechonology, Birmingham, USA). Depois de uma hora a 37°C, as placas foram lavadas com PBS (dez vezes) e, finalmente, 50µL de tampão

substrato (OPD (5mg/mL e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20µL/30V) diluídos em tampão citrato-fosfato, pH 5,0) foram adicionados em cada poço da placa. Ácido sulfúrico a 2,5N foi usado para interromper a reação e a densidade óptica (DO) foi mensurada na leitora de ELISA (Behring), usando-se comprimento de onda de 492nm. Controles negativos foram utilizados em todas as placas.

### Análise Estatística

Os resultados das titulações dos anticorpos antiPGL-1 presentes no soro dos indivíduos estudados foram expressos pela média ± desvio padrão (DP) da densidade óptica (DO) na diluição de 1/400. Os grupos foram comparados pelo método da Análise de Variância (ANOVA). A diferença entre eles foi estabelecida utilizando-se teste T, com p<0,05.

## RESULTADOS

### Características clínicas e socioepidemiológicas

Este trabalho mostra que a frequência de pacientes com a forma multibacilar da doença é maior, predominando os indivíduos do sexo masculino. Além disso, todos os pacientes e seus contatos domiciliares apresentaram níveis séricos detectáveis de anticorpos totais antiPGL-1, independentemente da forma clínica do paciente. Os indivíduos portadores de hanseníase foram classificados clinicamente como paucibacilares (Indeterminada (I) e Tuberculóide (T)) e multibacilares (Dimorfa (D) e Virchowiana (V)). A frequência das diferentes formas clínicas da hanseníase em 102 pacientes portadores da doença, participantes do estudo, assim como o contato prévio com indivíduos doentes estão apresentados na Tabela 1. Houve um predomínio da forma multibacilar da doença entre esses pacientes (I=4; T=11; D=41; V=25; RR=9; ENH=12). A maioria deles, tanto os multibacilares quanto os paucibacilares, era do sexo masculino e estava na faixa etária de 6 a 51 anos.

*Tabela 1.* Distribuição dos pacientes estudados por forma clínica, e contato prévio com indivíduos portadores de hanseníase.

Forma Clínica	Sim		Não		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Indeterminada	2	1,9	2	1,9	4	3,9
Tuberculóide	4	3,9	7	6,9	11	10,9
Dimorfa	12	11,8	29	28,4	41	40,2
Virchowiana	7	6,9	18	17,7	25	24,5
Reação Reversa	4	3,9	5	4,9	9	8,8
Eritema Nodoso Leproso	4	3,9	8	7,9	12	11,8
Total	33	32,3	69	67,7	102	100,00

A análise da presença ou da ausência da cicatriz vacinal está apresentada na Tabela 2. Observou-se que 63,7% dos pacientes não possuíam cicatriz vacinal.

Os contatos domiciliares dos pacientes examinados apresentaram idades que variaram entre 6 e 60 anos. A frequência de distribuição dos contatos de acordo com a forma clínica do doente foi muito variada (I=13,64%; T=12,12%; D=21,21%; V=12,12%; RR=1,52%; ENH=39,4%). Verificou-se que, o sexo feminino predominava entre os contatos e que cerca de 3% deles já haviam tido a doença. O grau de parentesco entre os pacientes e seus contatos domiciliares ficou assim distribuído: irmão (25%), filho (19%), sobrinho (11%), esposo (10%), pais (9%), primo (6%), avós (5%), neto (3%).

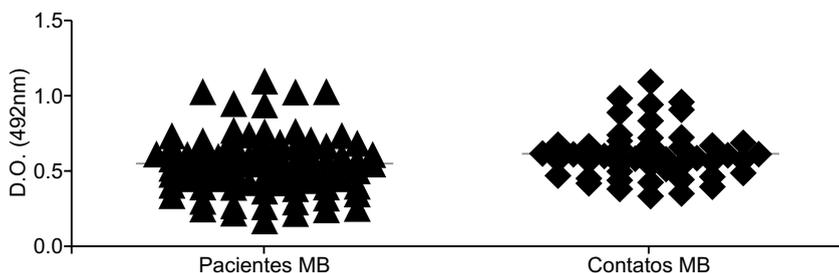
*Tabela 2.* Distribuição dos portadores de hanseníase estudados por forma clínica, segundo número de cicatriz vacinal de BCG.

Forma Clínica	1 cicatriz		2 cicatrizes		Não tem cicatriz		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Indeterminada	1	0,98	0	0,00	3	2,9	4	3,9
Tuberculóide	6	5,9	0	0,00	5	4,9	11	10,8
Dimorfa	13	12,8	1	0,98	27	26,5	41	40,2
Virchowiana	6	5,9	1	0,98	18	17,7	25	24,5
RR	0	0,00	1	0,98	8	7,9	9	8,8
ENL	7	6,9	1	0,98	4	3,9	12	11,8
Total	33	32,4	4	3,9	65	63,7	102	100,00

RR: reação reversa; ENL: Eritema Nodoso Leproso

### Níveis séricos de anticorpos totais antiPGL-1

A análise comparativa entre todas as formas clínicas, tanto dos pacientes quanto dos contatos, mostrou que todos foram positivos para PGL-1 na diluição do soro de 1/400. Os contatos de pacientes multibacilares apresentaram níveis séricos de anticorpos antiPGL-1 semelhantes aos doentes (Figura 1), ao passo que os contatos de pacientes paucibacilares apresentaram níveis séricos menores que os doentes (Figura 2).



*Figura 1.* Níveis séricos de anticorpos totais anti-PGL-1 de soro de indivíduos portadores de hanseníase multibacilar e seus contatos domiciliares.

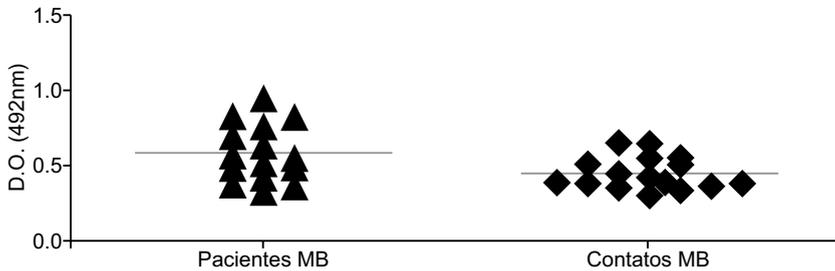


Figura 2. Níveis séricos de anticorpos totais anti-PGL-1 de soro de indivíduos portadores de hanseníase paucibacilar e seus contatos domiciliares.

## DISCUSSÃO

Pacientes com a forma multibacilar da hanseníase e do sexo masculino predominaram no período estudado (1999-2001). Tanto os pacientes quanto os seus contatos domiciliares apresentaram níveis séricos mensuráveis de anticorpos totais para antiPGL-1.

A análise dos dados obtidos neste estudo demonstra um predomínio das formas clínicas multibacilares (76,5%) entre os 102 pacientes estudados, destacando-se um grande número de pacientes com a forma dimorfa (40,2%). Estes dados nos sugerem que o diagnóstico da hanseníase tem sido realizado tardiamente, o que favorece um maior número de manifestações e lesões decorrentes da própria evolução da doença, bem como a manutenção de sua transmissão. Estes achados também foram observados nos estudos realizados por Helene et al. (2001) e Santos & Rabay (2001).

Jacobson & Krahenbuhl (1999) e Harrop (2002) descreveram que a hanseníase é mais comum entre os homens, tendo os dois trabalhos encontrado proporção de 1,5:1 e 2:1, respectivamente. Nossos achados se assemelham aos desses autores e ao estudo realizado por Goulart et al. (2002) em 138 pacientes da cidade de Uberlândia-MG, que demonstrou a predominância do sexo masculino em todas as formas clínicas da doença estudadas. No entanto, não se pode afirmar se, na hanseníase, realmente existe predileção pelo sexo masculino.

Segundo Talhari (1997), o contágio da hanseníase ocorre por meio do contato íntimo e prolongado com doentes bacilíferos não tratados. Os dados referentes ao contato dos pacientes deste estudo com portadores de hanseníase mostraram que 67,7% não relatam contato com outros doentes. Possivelmente, este contato existiu, porém não tomaram conhecimento do fato. Isso é possível por causa da elevada endemicidade da hanseníase na região. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO), em Goiás, somente em 2006 foram notificados 2.989 casos novos de hanseníase (OPAS, 2007).

Atualmente, vários estudos têm discutido o papel do BCG na proteção contra doenças causadas por micobactérias. Um grande questionamento é se esta vacina protege o indivíduo contra a hanseníase. A variação dos índices de proteção da vacina BCG contra tuberculose tem sido atribuída a vários fatores como: diferenças na preparação do BCG, influência e exposição ambiental a infecção com micobactérias e diferenças genéticas e nutricionais entre a população (Fine, 1995). Apesar das controvérsias, a vacinação repetida com a BCG é uma prática padrão preconizada pelo Ministério da Saúde (MS, 2002) para proteção contra a hanseníase. Fine (1995) destaca que o papel protetor do BCG na hanseníase é muito mais eficaz do que no caso da tuberculose pulmonar. Smith & Smith (2000) ressaltam que o BCG, usado em um grupo com risco elevado de desenvolver hanseníase, conferiu 50% de proteção, ocorrendo um aumento da proteção para 75% quando a vacinação neste grupo foi repetida. Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que 63,7% dos pacientes com hanseníase não possuíam cicatriz vacinal de ID-BCG e que apenas 32,4% dos pacientes estudados desenvolveram a doença mesmo sendo vacinados, confirmando assim os achados do estudo citado acima.

Graças à sua especificidade, o PGL-1 tem sido utilizado como um antígeno importante para o imunodiagnóstico da hanseníase. Índices elevados de anticorpos antiPGL-1, em contatos e na população em geral, indicam riscos de desenvolvimento da hanseníase; auxiliam na definição da forma clínica, transmissão e extensão da doença e servem também como dado auxiliar no diagnóstico da hanseníase nos indivíduos e seus contatos domiciliares (Sekula et al., 1998).

Todos os pacientes estudados apresentaram níveis séricos de anticorpos totais para PGL-1, tanto os da forma MB quanto os da forma PB. Os contatos de pacientes com a forma MB apresentaram níveis séricos de anticorpos para PGL-1 semelhantes aos doentes. Já os contatos de pacientes PB, apresentaram níveis séricos baixos desses anticorpos. Soares et al. (1994) e Roche et al. (1998) afirmaram, em seus trabalhos, que o risco de desenvolvimento da hanseníase nos contatos de pacientes soropositivos é muito maior do que na população em geral. Diversos estudos sorológicos vêm sendo desenvolvidos em regiões de elevada endemicidade e têm demonstrado que os contatos domiciliares de pacientes dessas regiões apresentam níveis mais elevados de anticorpos antiPGL-1 do que a comunidade em geral. Tais resultados ratificam uma grande associação entre os níveis de anticorpos antiPGL-1 apresentados e o risco de desenvolver a doença. Embora se apresentem como pessoas clinicamente sadias, os contatos dos pacientes MB revelaram sorologia superior à dos pacientes com a forma MB da doença (Figura 1). Chanteau et al. (1993), em um estudo realizado na Polinésia Francesa, acompanharam por um período de dez anos 204 contatos domiciliares de pacientes com hanseníase que apresentaram sorologia positiva para PGL-1. Nessa pesquisa, observaram que 2% deles desenvolveram a doença.

Com base nos dados já existentes na literatura, concluímos ser necessário um acompanhamento clínico dos contatos que apresentarem sorologia positiva para PGL-1.

Estratégias para controlar a transmissão da hanseníase exigem rápida detecção da doença e tratamento com PQT. Porém, o número de casos novos não diminuiu em vários anos, indicando a continuidade da transmissão (Meima et al., 2004). A falta de testes diagnósticos disponíveis para a detecção precoce da doença leva a uma busca crescente por aprimoramento ou mesmo proposição de novos testes. Cardona-Castro et al. (2008) demonstraram que a presença de anticorpos antiPGL-1 em contatos de pacientes com hanseníase não foi associada com índice bacilar ou diagnóstico clínico do paciente. Isso sugere que o contato com o *M. leprae* pode ocorrer, mas respostas imunológicas diferentes estão influenciando a soroprevalência e a evolução da doença. Portanto, os níveis séricos de anticorpos antiPGL-1 encontrados neste trabalho podem não indicar a verdadeira frequência de indivíduos infectados na população estudada, uma vez que algumas pessoas infectadas não produzem anticorpos específicos (Oskam et al., 2003).

No presente estudo, a pesquisa de anticorpos antiPGL-1 foi positiva tanto nos pacientes MB quanto PB. Porém, pacientes MB tiveram níveis séricos maiores que pacientes PB, indicando que a produção de anticorpos é maior onde há mais antígeno, ou seja, nos multibacilares. É bem provável que, para se conseguir uma forma eficaz de diagnóstico laboratorial de todos os casos de hanseníase, seja necessária a associação de um método para avaliar a resposta humoral, por exemplo a pesquisa de anticorpos PGL-1 pelo método dipstick (Bührer-Sékula et al., 2001) para as formas MB da doença, com um outro método baseado em imunidade celular. O método atualmente disponível que utiliza a IgM antiPGL-1 ainda continua sendo a melhor forma de diagnóstico. Entretanto, a dosagem de anticorpos totais antiPGL-1 não permite a discriminação dos contatos domiciliares que se tornarão doentes. Mas é um dado que determina quem deve ser acompanhado clinicamente para que seja feito o diagnóstico precoce da hanseníase, o que possibilitará interromper a cadeia de transmissão.

#### AGRADECIMENTOS

Órgão financiador: CNPq, Institutos do Milênio.

#### ABSTRACT

Evaluation of total serum antibodies against phenolic glycolipid-1 (PGL-1) of *Mycobacterium leprae* in individuals with Hansen disease and their house contacts in the State of Goiás, Brazil

Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligatory intracellular bacillus that infects preferentially skin macrophages and Schwann cells of peripheral nerves. The diagnosis of the disease is complex as there are several clinical manifestations. New diagnostic tests aiming the control of disease

transmission are being pursued, among which we highlight the dosage of IgM anti phenolic glycolipid-1 (PGL-1). Total serum antibodies against PGL-1 in patients and in their household contacts were evaluated by enzyme immunoassay. Both patients and their contacts presented detectable levels of anti-PGL-1 in the serum thus indicating a potential risk of transmission of the disease among these individuals.

**KEY WORDS:** *Mycobacterium leprae*. ELISA. Antibodies anti-PGL-1. Leprosy. Household contacts.

## REFERÊNCIAS

1. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Van Mosseveld P, Faber WR, Klatser PR, Oskam L. Risk factors for developing leprosy: a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev* 77: 48-61, 2006.
2. Bernardi C. Leprosy classification in control programs. *Hansen Intern* 6: 130-135, 1981.
3. Brennan PJ. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. *Lepr Rev* 71: 50-54, 2000.
4. Bühner-Sékula S, Cunha MG, Foss NT, Oskam L, Faber WR, Klatser PR. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. *Trop Med Int Health* 6: 317-323, 2001.
5. Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate JC, Manrique-Hernández R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 332-336, 2008.
6. Cardona-Castro N, Restrepo-Jaramillo S, Gil de la Ossa M, Brennan P. Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 703-707, 2005.
7. Chanteau S, Glaziou P, Plichart C, Luquiaud P, Pichart R, Faucher JF, Cartel JL. Low predictive value of PGL-1 serology for the early diagnosis of Leprosy in family study in French Polynesia. *Int J Lepr Mycob Dis* 61: 533-541, 1993.
8. Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 346: 2089-2090, 1995.
9. Fleury RN. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling – Uma análise morfológica. *Hansen Intern* 26: 14-30, 1989.
10. Goulart IMB, Dias CM, Oliveira ACS, Silva AA, Alves RR, Quaresmim CR, Silva DP, Lopes MRF, Faria GA. Degree of incapacity: an indicator for hidden prevalence and Program Quality of Leprosy Control in a University Health Center in the Uberlândia District. *Hansen Intern* 27: 5-13, 2002.
11. Habib AA, Mozaffar T. The neuropathology of leprosy. *Hist Neurol* 59: 138-140, 2002.
12. Harrop E. Leprosy. *J Med* 3: 2-10, 2002.
13. Helene LMF, Leão VM, Minakawa MM. The social situation and the presents of physical disabilities among leprosy patients registered at a Public Health Center in São Paulo City. *Hans Int* 26: 5-13, 2001.
14. Jacobson RR, Krahenbuhl JL. Leprosy. *Lancet* 353: 655-660, 1999.
15. Jopling WH, Ridley DS Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Mycob Dis* 34: 255-273, 1966.
16. Lockwood DN. Leprosy elimination - a virtual phenomenon or a reality? *British Med J* 324:1516-1518, 2002.
17. Lockwood DNJ, Kumar B Treatment of leprosy. *British Med J* 328: 1447-1448, 2004.
18. Meima A, Smith WCS, van Ootmarsen GJ, Richardus JH, Habbema DF The future incidence of leprosy: a scenario analysis. *Bull World Health Organ* 5: 373-380, 2004.
19. Ministério da Saúde. *Guia de Controle da Hanseníase*. Brasília, 1994. p. 156.

20. Ministério da Saúde. Portaria N. 1.073/GM de 26 de setembro de 2000. Brasília, 2000. p. 20.
21. Ministério da Saúde. *Guia para o Controle da Hanseníase*, 2002.
22. Ooi WW, Moschella L. Update on leprosy in immigrants in the United States: status in the year 2000. *Clin Inf Dis* 32: 930-937, 2001.
23. Organização Mundial de Saúde. *Global Strategy for Further Reducing the Leprosy Burden and Sustaining Leprosy Control Activities* (Plan Period 2005-2010), 2005.
24. Organização Mundial de Saúde. *Report of the global forum on elimination of Leprosy as a public health problem*, 2006.
25. Organização Pan-americana de Saúde. *Situação atual da hanseníase no estado Goiás, Brasil, 2001 a 2006*. 2007.
26. Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 74: 196-205, 2003.
27. Patil AS, Ramu G, Prasad R. Detection of disease immune complexes in the serum of leprosy patients: A novel single step method. *J Neuroimm* 105: 64-68, 2000.
28. Rambukkana A. Molecular basis of the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol* 4: 21-27, 2001.
29. Roche P, Dockrell H, Brennan P. Progress in research towards a world without leprosy. Report of a WHO meeting in Ethiopia, February 1998. *Lepr Rev* 69: 151-159, 1998.
30. Santos LP, Rabay FO. Epidemiological situation of leprosy control in Taubaté SP municipality in 1999. *Hans Int* 26: 112-116, 2001.
31. Sehgal VN, Rege VL, Reys M. Correlation between clinical and histopathologic classification in leprosy. *Int J Lepr Mycobact Dis* 45: 278-280, 1977.
32. Sekula SB, Cunha MGS, Ferreira WA, Klaster PR. The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 21: 197-201, 1998.
33. Smith CM, Smith WCS. Chemoprophylaxis is effective in the prevention of leprosy endemic countries: a systematic review and meta-analysis. *J Influence Account* 41: 137-142, 2000.
34. Soares DJ, Failbus S, Chalise Y, Kathet B. The role of IgM antiphennolic glycolipid-1 antibodies in assessing household contacts of leprosy patients in a low endemic area. *Lepr Rev* 4: 300-304, 1994.
35. Stefani MM, Martelli CM, Morais-Neto OL, Martelli P, Costa MB, de Andrade AL. Assessment of anti-PGL-I as a prognostic marker of leprosy reaction. *Int J Lepr Mycobact Dis* 66: 356-364, 1998.
36. Talhari S, Neves RG. *Hanseníase*. 3a.ed. Gráfica Tropical, Manaus, 1997.
37. Treo MM. Bacteriologia. In: Ministério da Saúde, *Noções de leprologia*, Rio de Janeiro, 1969. p. 9-17.
38. Weir RE, Brennan PJ, Butlin CR, Dockrell HM. Use of a whole blood assay to evaluate in vitro T cell responses to new leprosy skin test antigens in leprosy patients and healthy subjects. *Clin Exp Immunol* 116: 263-269, 1999.