

Associação do teste sorológico ML Flow com a baciloscopia

Association of the ML Flow serologic test to slit skin smear

Sandra Lyon¹, Rozana Castorina da Silva^{1,2}, Ana Cláudia Lyon^{1,2},
Maria Aparecida de Faria Grossi^{2,3}, Silvia Helena Lyon¹, Maria de Lourdes Azevedo⁴,
Samira Bühner-Sékula⁵ e Manoel Otávio da Costa Rocha²

RESUMO

Realizou-se estudo descritivo e exploratório relacionando as covariáveis aos resultados do teste sorológico ML Flow e baciloscopia. Foram estudados 60 casos novos de hanseníase diagnosticados no Centro de Referência em Dermatologia Sanitária. Para a baciloscopia, foi utilizada a coleta de esfregaço dérmico em quatro sítios, sendo o resultado expresso pelo índice baciloscópico. O ML Flow foi registrado de modo qualitativo e semi-quantitativo. Para o estudo da concordância, foi utilizado o índice de Kappa e, para sua interpretação, os critérios de Landis e Koch. Para análise estatística foram realizados a regressão logística e o teste de Kruskal-Wallis. O ML Flow mostrou forte associação com a baciloscopia, observou-se que o aumento gradativo do índice baciloscópico foi acompanhado pelo aumento semi-quantitativo dos níveis de anticorpos medidos pelo ML Flow, tendo sido positivo em 100% dos casos com baciloscopia positiva. Os resultados deste estudo evidenciaram que o ML Flow, por estar fortemente correlacionado à baciloscopia, poderá tornar-se um valioso instrumento auxiliar na classificação e alocação dos pacientes para fins de tratamento.

Palavras-chaves: Hanseníase. Testes sorológicos. Baciloscopia. ML Flow.

ABSTRACT

A descriptive, exploratory study was conducted analyzing the association of covariables in the results of the ML Flow serological test and slit skin smear. A total of 60 leprosy cases diagnosed at the state Sanitary Dermatology Referral Center were investigated. Slit skin smear samples were collected from four sites and the results were expressed by the bacillary index. ML Flow was registered in both qualitative and semi-quantitative terms. Cohen's kappa coefficient was used to study the agreement with Landis and Koch's observer criteria for interpretation. For statistical analysis, the logistic regression model and Kruskal-Wallis test were used. ML Flow showed a strong association with slit skin smear results, since a gradual increase in BI was accompanied by a semi-quantitative rise in antibody levels measured by ML Flow, with 100% positivity in cases presenting a positive slit skin smear. Given its strong correlation to slit skin smear, the results of this study provide evidence that the ML Flow test could be a valuable auxiliary tool in the classification and treatment of leprosy patients.

Key-words: Leprosy (Hansen's disease). Serological tests. Slit skin smear. ML Flow.

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, e o seu diagnóstico baseia-se na identificação de seus sinais e sintomas, devendo ser classificada em paucibacilar (PB) ou multibacilar (MB) para fins de tratamento².

A baciloscopia é o exame complementar mais importante na hanseníase para identificar o agente causal, sendo, porém, negativo nas formas paucibacilares e em alguns pacientes multibacilares, necessitando, ainda, para sua execução de infraestrutura laboratorial e de profissionais capacitados, inexistentes na maioria dos serviços de atenção básica².

O antígeno glicolípido fenólico-1 (PGL-1) é específico do *Mycobacterium leprae* e leva à formação de anticorpos das

classes IgG e IgM. Os títulos de IgM correlacionam-se com as formas clínicas e com a atividade da doença¹. Na hanseníase da forma virchowiana têm sido descritos níveis aumentados do anti-PGL-1, os quais tendem a decrescer com o tratamento específico³.

O ML Flow é um teste imunocromatográfico que detecta anticorpos IgM e, por refletir a carga bacilar, auxilia na classificação das formas clínicas de hanseníase em pacientes pauci e multibacilares, para fins de tratamento^{3,6}. Trata-se de método simples, de baixo custo e fácil execução, não necessitando de laboratório³, e que poderá ser utilizado na rotina dos serviços de saúde, incluindo os de atenção básica e as equipes do programa de saúde da família⁶.

Para fins de tratamento, a classificação dos pacientes baseada no número de bacilos presentes no seu organismo⁵ é muito importante, e a relação entre níveis de anticorpos e o índice baciloscópico - IB, indica que a sorologia possa ser utilizada como técnica alternativa para classificação dos pacientes^{1,7,8}.

A combinação de critérios clínicos e laboratoriais, mais especificamente, de testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos para os antígenos glicolípidos fenólicos do *Mycobacterium leprae*, pode ser utilizada como teste complementar para a correta alocação do paciente com hanseníase na poliquimioterapia⁶. Estudos mostram que o teste sorológico ML Flow para detecção de anticorpos IgM reflète a carga bacilar podendo auxiliar na classificação das formas clínicas de hanseníase^{7,8}.

1. Serviço de Dermatologia Sanitária, Hospital Eduardo de Menezes, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 2. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 3. Coordenação Estadual de Dermatologia Sanitária, Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 4. CEMEPE - Centro de Medicina Especializada Pesquisa e Ensino, Belo Horizonte, MG, Brasil. 5. KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands e Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Sandra Lyon. Avenida do Contorno 4852, sala 601, Bairro Funcionários, 30110-032, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Telefax: 55 31 3227-0092

e-mail: sandralyon@ig.com.br; cemepe@cemepegm.com.br

Este trabalho teve por objetivo estudar a relação entre os níveis de anticorpos detectados pelo teste sorológico ML Flow e a carga bacilar medida pelo índice baciloscópio.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

A população estudada foi constituída de 60 casos novos de hanseníase diagnosticados no Centro de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes ou referenciados ao mesmo, no período de março a dezembro de 2006. Os sujeitos desta pesquisa submeteram-se ao teste sorológico ML Flow após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, conforme parecer do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes em 12/04/2006.

Os 60 pacientes foram classificados utilizando-se a classificação operacional da OMS, levando-se em consideração a contagem do número de lesões de pele. Para a baciloscopia, foi utilizado o IB, conforme escala logarítmica de Ridley, que varia de zero a seis, através da coleta de esfregaço dérmico em quatro sítios: lesão cutânea, cotovelo contra-lateral e lóbulos auriculares. O teste ML Flow foi registrado de modo qualitativo (positivo ou negativo) e semi-quantitativo (zero, 1+, 2+, 3+ e 4+) de acordo com Bühner-Sékula e cols³. Os dados foram coletados, para análise posterior, no formulário-ficha do paciente, contendo dados de identificação, número de lesões, número de nervos acometidos, resultado da baciloscopia, resultado do teste ML Flow.

A análise estatística destes resultados foi realizada através da regressão logística ordinal⁹ e Teste de Kruskal-Wallis¹⁰. Para o estudo da concordância, foi utilizado o índice de Kappa e, para sua interpretação, os critérios de Landis e Koch.

RESULTADOS

A idade variou de 10 a 78 anos com a média de 46,5 anos. O número de lesões cutâneas variou de 0 a 20 e o de nervos acometidos de 0 a 8. A média do IB foi de 1,2 com desvio-padrão de 1.692. **Tabela 1.**

A soropositividade ocorreu em 70% dos pacientes, enquanto a baciloscopia foi positiva em 40% dos casos (**Tabela 2**). A concordância observada entre o resultado do teste sorológico e a baciloscopia foi de 70%, considerada moderada (Kappa = 0,44), de acordo com os critérios de Landis e Koch. Observou-se que 18 pacientes, isto é, 50% dos casos com baciloscopia negativa

TABELA 1

Estatísticas descritivas dos 60 casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, 2006.

Variável	Número	Mín	Máx	Média	Desvio-padrão
Idade	60	10	78	46,5	14,46
Número de lesões cutâneas	60	0	20	2,7	4,153
Número de nervos comprometidos	60	0	8	0,57	1,661
Índice Baciloscópio	60	0	5	1,2	1,692

TABELA 2

Concordância entre a baciloscopia e o teste sorológico ML Flow dos 60 casos novos de Hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, 2006.

		Baciloscopia					
		positiva		negativa		total	
		nº	%	nº	%	nº	%
ML Flow	Positivo	24	100,0	18	49,0	42	70,0
	Negativo	-	-	18	51,0	18	30,0
Total		24	100,0	36	100,0	60	100,0

Índice de kappa = 0,44 valor-p = <0,001

tiveram a sorologia positiva. Dentre os pacientes com baciloscopia positiva, todos foram ML Flow positivo.

A **Tabela 3** apresenta a análise múltipla dos fatores associados à soropositividade do teste ML Flow: baciloscopia e o número de lesões cutâneas. Na interpretação desse modelo, o paciente que apresentou resultado positivo à baciloscopia teve aproximadamente 19 vezes (OR: 19,38) a chance de ter resultado positivo do teste ML Flow, quando comparado àquele que apresentou resultado negativo à baciloscopia. O paciente com 6 ou mais lesões cutâneas teve 6 vezes (OR:6,04) a chance de ter resultado positivo do teste ML Flow quando comparado àquele que apresentou até 5 lesões na pele.

O IB categorizado foi associado aos níveis do teste sorológico ML Flow, conforme mostrado na **Tabela 4** e na **Figura 1**. Dos pacientes estudados, 60% apresentaram baciloscopia negativa e 28,3% apresentaram IB igual ou maior que dois, sendo que

TABELA 3

Análise múltipla dos fatores associados à soropositividade do teste ML Flow nos 60 casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, 2006.

Variáveis	ML Flow (+)		Odds ratio	IC (95%)	Valor-p
	nº	%			
Baciloscopia					
Negativa	18	42,9	1,0	-	0,007
Positiva	24	57,1	19,38	(2,28; 164,96)	
Número de Lesões cutâneas					
≤ 5 lesões	23	54,8	1,0		
≥ 6 lesões	19	45,2	6,04	(1,11; 32,95)	0,020

IC: intervalo de confiança.

TABELA 4

Distribuição dos resultados do teste ML Flow segundo o índice bacilosκόpio em 60 casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, 2006

Índice Bacilosκόpio	Teste ML Flow					Total	
	0	+1	+2	+3	+4	nº	%
0,0	18	9	2	5	2	36	60,0
0,1 – 0,9	0	1	1	0	1	3	5,0
1,0 – 1,9	0	1	2	0	1	4	6,7
2,0 – 2,9	0	0	0	1	3	4	6,7
3,0 – 3,9	0	0	0	1	4	5	8,3
4,0 – 4,9	0	1	0	0	5	6	10,0
5,0 – 5,9	0	0	1	0	1	2	3,3
6,0	0	0	0	0	0	0	0
Total	nº	18	12	6	7	17	
	%	30	20	10	11,7	28,3	60 100,0

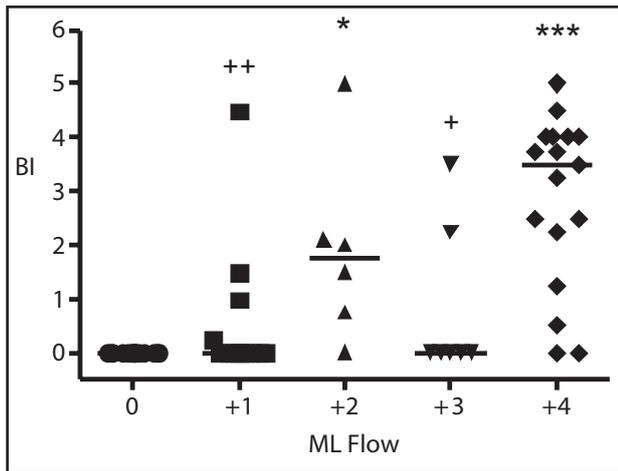


FIGURA 1

Resultado do índice baciloscópico de acordo com o resultado semi-quantitativo do teste ML Flow dos casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes, 2006. 0: N=18; +1: N=12; +2: N=6; +3: N=7; +4: N=17. Análise estatística foi realizada com o teste Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste Dunn de comparação múltipla. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ (vs. 0); + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ (vs. +4).

os índices de 3,0 a 4,9 corresponderam a 18,3% dos casos. Observou-se que o resultado da baciloscopia mostrou-se associado ao teste ML Flow.

Pacientes que apresentaram altos índices baciloscópicos evidenciaram 19 vezes a chance de ter um resultado do teste sorológico na categoria mais alta (4+), quando comparado àqueles pacientes que apresentaram baixos valores de IB (Tabela 3). Foi observado, ainda, que mesmo pacientes com IB baixos podem apresentar níveis de resposta altos para o teste sorológico ML Flow (Tabela 4 e Figura 1).

A Figura 1, mostra a associação dos resultados semi-quantitativos do ML Flow e o índice baciloscópico, incluindo a análise estatística do Kruskal-Wallis.

DISCUSSÃO

A soropositividade (70%) foi superior à observada por Lyon (57%)^{7,8} e Grossi (50,8%)⁶, bem como, no Nepal (35,6%)⁴ e na Nigéria (62,9%)⁴. Esses estudos demonstraram que os níveis de anticorpos específicos aos antígenos glicolipídicos fenólicos do *Mycobacterium leprae* correlacionam-se à carga de bactérias dos portadores de hanseníase^{4,6,7,8}. A maioria dos pacientes classificados como MB tem altos níveis de anticorpos tipo IgM anti-PGL-1, ao contrário dos classificados como PB, que geralmente têm sorologia negativa, e o nível desses anticorpos correlaciona-se diretamente com a quantidade de *Mycobacterium leprae* nos pacientes, diminuindo no decorrer do tratamento⁵. No presente estudo, observou-se concordância moderada (κ : 0,44) entre a baciloscopia e o ML Flow (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Grossi (κ : 0,48)⁶ e Lyon (κ : 0,49)^{7,8}. Salienta-se que 18 (50%) dos pacientes com baciloscopia negativa foram soropositivos, significando que seriam classificados como PB, se fosse usada somente a baciloscopia como critério de classificação. Tal fato sugere que o teste sorológico possa ser mais

sensível que a baciloscopia na detecção dos verdadeiros MB. Por outro lado, a sorologia foi positiva em 100% dos pacientes com baciloscopia positiva (Tabela 4). No trabalho de Bühner-Sékula e cols³, o ML Flow foi positivo em 97,4% dos MB e em 97,8% dos pacientes com IB ≥ 2 .

A associação do índice baciloscópico e o ML Flow apontou que, à medida que o IB aumenta, o resultado do teste sorológico também aumenta, como foi demonstrado por Lyon (2005)^{7,8}.

O presente trabalho evidenciou forte associação entre o teste sorológico e a baciloscopia, e mostrou que o teste ML Flow, foi capaz de detectar a soropositividade em metade dos pacientes com baciloscopia negativa, fato de grande importância, especialmente para os profissionais das unidades básicas de saúde, os quais teriam mais segurança na classificação, uma vez que os resultados vão de encontro às observações na rotina.

CONCLUSÃO

Observou-se associação estatisticamente significativa entre o resultado do teste sorológico ML Flow e a baciloscopia. O estudo mostrou que a incorporação do teste sorológico ML Flow como instrumento auxiliar na classificação dos pacientes de hanseníase, para fins de terapêutica, poderia prevenir tratamento possivelmente insuficiente em casos clinicamente paucibacilares (que apresentaram sorologia positiva) e tratamento possivelmente excessivo em pacientes clinicamente multibacilares (com sorologia negativa), em importante número de casos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Secretaria Estadual de Saúde de Minas Gerais (Belo Horizonte, Brasil) e KIT Biomedical Research Department (Amsterdam, the Netherlands) pelo suporte técnico e o Netherlands Leprosy Relief (Amsterdam, Netherlands) pelo suporte financeiro. O NT-P-BSA usado na produção do teste sorológico ML Flow foi gentilmente fornecido por Dr. Fujiwara, Institute for Natural Science, Nara University, Nara, Japan.

REFERÊNCIAS

1. Barros RPC, Oliveira MLWDR. Detecção de anticorpos específicos para antígeno Glicolípido Fenólico-1 do *M. leprae* (anti-PGL-1 IgM): aplicações e limitações. Anais Brasileiros de Dermatologia 75: 745-753, 2000.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Guia para o controle da hanseníase. Cadernos de Atenção Básica, nº 10, Brasília, 2002.
3. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L. Simple and fast lateral Flow Test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. Journal of Clinical Microbiology 41: 1991-1995, 2003.
4. Bühner-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MAE, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L. The ML FLOW test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. Leprosy Review 78: 70-79, 2007.
5. Gallo MEN, Ramos Jr LAN, Albuquerque ECA, Nery JAC, Sales AM. Alocação do paciente hanseniano na poli quimioterapia: correlação da classificação baseada

- no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 78: 415-424, 2003.
6. Grossi MAF. Estudo das possíveis mudanças na classificação da hanseníase com utilização do Teste ML Flow e suas implicações no tratamento e controle da endemia em Minas Gerais. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
 7. Lyon S. Estudo comparativo da carga bacilar em casos novos de hanseníase e o resultado do Teste Sorológico ML Flow. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
 8. Lyon S, Lyon AC, Castorina-Silva R, Grossi MAF, Lyon SH, Bühner-Sékula S, Rocha MOC. A comparison of ML Flow serology and slit skin smears to assess the bacterial load in newly diagnosed leprosy patients in Brazil. *Leprosy Review* 79: 1-9, 2008.
 9. Mccullagh P. Regression models for ordinal data. *Journal of the Royal Statistical Society*, 42: 109-142, 1980.
 10. Zar JH. *Bioestatistical analysis*. 2nd edition. Englerwood Chiffs: Printice-Hall. 1984.