



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE



MARILENA MARIA DE SOUZA

RASTREAMENTO DA HANSENÍASE E INFECÇÃO DO
***MYCOBACTERIUM LEPRAE* UTILIZANDO OS ANTÍGENOS**
RECOMBINANTES LID-1 E PADL

TESE DE DOUTORADO

Salvador
2013

MARILENA MARIA DE SOUZA

**RASTREAMENTO DA HANSENÍASE E INFECÇÃO DO
MYCOBACTERIUM LEPRAE UTILIZANDO OS ANTÍGENOS
RECOMBINANTES LID-1 E PADL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina e Saúde, da Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Medicina e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Martins Netto

Salvador
2013

Dados Internacionais de Catalogação -na- Publicação - (CIP)
Denize Santos Saraiva Lourenço - Bibliotecária CRB/15-1096
Cajazeiras – Paraíba

S729r Souza, Marilena Maria
Rastreamento da hanseníase e infecção do
Mycobacterium leprae utilizando os antígenos
recombinantes LID - 1 e PADL / Marilena Maria de
Souza. Bahia, 2013.
69f . : il.

Bibliografia.

Orientador: Eduardo Martins Netto.
Tese (Doutorado)Universidade Federal da Bahia,2013.

1.Hanseníase. 2.Saúde Pública. 3.Hanseníase e
infecção – diagnósticos. 4.Antígenos recombinantes
LID-1 e PADL. I. Martins Netto, Eduardo.
III.Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

UFCG /CFP/BS

CDU - 616-002.73

COMISSÃO EXAMINADORA

TITULARES:

Prof. Dr. Adelmir Machado
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof. Dr. Mansueto Neto
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Profª Drª Alana Abrantes Nogueira Pontes
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Prof. Dr. José Cezário de Almeida
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Profª Drª Renata de Souza Coelho Soares
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

SUPLENTE:

Prof. Dr. Eduardo Martins Netto
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcelino Carolino de Souza e Terezinha Maria de Souza, pelo amor incondicional e por serem grandes incentivadores para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus irmãos Vera-Lucia, Mauricéa, Flávio e Valdice, pelo apoio constante nesta caminhada.

Aos meus sobrinhos Magno, Jardel Rhodes, Marcelino e Matias, que me estimulam a olhar para o futuro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por minha família e por sua presença iluminando meu caminho durante a trajetória, para realização deste trabalho;

Ao Dr. Eduardo Martins Netto, pela eficiência na orientação;

À Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) que, juntas, não mediram esforços na realização do Doutorado Interinstitucional (DINTER);

Aos Coordenadores do DINTER UFBA/UFCG, Dra. Helma Cotrim, Dr. Adelmir Machado, Dr. Patrício Marques e Dra. Teresa Nascimento, pela dedicação e apoio na concretização do DINTER;

Aos colegas do DINTER UFBA/ UFCG em especial a Gerson Bragagnoli, Luciano Holanda, Homero, Abrão Amério, Raimunda Neves, Betânia Maria, Lourdes Campos, Erlane Aguiar, José Rômulo, Luciana Moura, pelo companheirismo encorajador;

Ao Dr. José Cezário de Almeida, Diretor do CFP/UFCG, pelo apoio dispensado ao DINTER;

À equipe Estratégia da Saúde da Família, Valdice, Gerlane, Suelania, Marcelane, Vinicius e Henrique pela dedicação e competência na realização do atendimento aos participantes da pesquisa;

Às técnicas de enfermagem Jucilene, Serginara, Lourdinha, Maria das Neves pela relevante colaboração;

Aos agentes comunitários de saúde que no dia-dia estavam juntos nos orientando para a concretização do estudo;

Aos professores e técnicos administrativos da UFCG e UFBA envolvidos com a realização do DINTER, pelos ensinamentos e colaboração;

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do estudo, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

Lista de tabelas, quadros e figuras.....	06
Lista de siglas	07
1 Resumo em inglês e português	09/10
2 Introdução.....	11
3 Objetivos	13
4 Artigos	14
4.1 Artigo 1 – Ferramentas no Diagnóstico da Hanseníase: o convencional e as inovações.....	15
4.2 Artigo 2– Identifying the reasons why these contacts do not go to the USF for the dermatoneurological examination.....	22
4.3 Artigo 3 – Screening leprosy and <i>Mycobacterium leprae</i> infection using LID-1 and PADL recombinant antigens.....	44
5 Conclusões.....	57
6 Considerações Finais	58
7 Perspectivas do estudo.....	59
Apêndice A – Ficha de Coleta de Dados	60
Apêndice B – Consentimento Informado Livre Esclarecido	63
Anexo A – Declaração do Comitê de Ética.....	65
Anexo B – Normas de formatação da Revista Lancet Infectious Diseases.....	66
Anexo C – Normas de formatação da Revista Brasileira de Medicina (RBM).....	67

LISTA DE TABELAS, FIGURAS E QUADROS

Table 1– Age and Gender in the population and sample examined for the Hansen’s disease Survey in Cajazeiras/Paraíba, Brasil - 2013.....	49
Table 2 – Prevalence of Hansen’s disease using LID-1 antigen as seromarker in Cajazeiras/Paraíba-Brazil, 2013	50
Table 3 – Prevalence of Hansen’s disease using PADL antigen as seromarker in Cajazeiras / Paraíba – Brazil – 2013.....	51
Table 4 - Association for LID-1 and PADL and comorbidities in the population sampled in Cajazeiras / Paraíba – Brazil, 2013	52
Figure 1 – Evaluation sequence and case finding using LID-1 and PADL as biomarkers in Cajazeiras, Paraíba, 2013.....	50
Box 1 – Sensitivity, specificity positive and negative predictive values of serology using LID-1 and PADL antigens in Capoeiras and Sol-Nascente / Paraíba Brazil, 2013.....	51

LISTA DE SIGLAS

BAAR	Bacilo Ácido Álcool Resistente
BB	Borderline
BL	Borderline Lepromatosa
BT	Borderline Tuberculóide
BI	Índice Baciloscópico
BCG	Bacilo Calmette Guerin
CE	Controle Endêmico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HHC	Contato domiciliar saudável
HPN	Hanseníase Neural Pura
IDEAL	Iniciativa para Ensaios Diagnósticos e Epidemiológicos para Hanseníase
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
LID 1	Leprosy IDRI Diagnostic- 1
LL	Lepra Lepromatosa
MB	Multibacilar
MDT	Terapia com Múltiplas Drogas
ML Flow	Teste de Fluxo Lateral
MLPA	Teste de Aglutinação com Partícula de Gelatina
PADL	Proteína Avançada para o Diagnóstico de Hanseníase
PB	Paucibacilar
PCR	Polymerase Chain Reaction (reação da cadeia de polimerase)
PGL-I	Glicolípido Fenólico-I
PHA	Teste de Hemaglutinação Passiva
PNCH	Programa Nacional de Controle da Hanseníase
PQT	Poliquimioterapia
RNA	Ácido Ribonucleico
RIC	Resposta Imune Celular
SSPS	Statistical Program for Social Science

TT	Tuberculóide
TB	Tuberculose
UBSs	Unidade Básica de Saúde
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
UFBA	Universidade Federal da Bahia
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

1RESUMO

RASTREAMENTO DA HANSENÍASE E INFECÇÃO DO *MYCOBACTERIUM LEPRAE* UTILIZANDO OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES LID-1 E PADL

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae* que afeta, em geral, a pele e os nervos periféricos. Apesar do uso crescente da poliquimioterapia, o número de novos casos ainda se mantém constante em muitos países. Um dos mais graves problemas para a eliminação da doença é a ausência de teste de especificidade e sensibilidade elevada. Este estudo tem como objetivo realizar o rastreamento da hanseníase e infecção do *Mycobacterium leprae* utilizando os antígenos recombinantes LID-1 e PADL em um município hiperendêmico, usando base populacional. O estudo foi realizado no município de Cajazeiras, sertão da Paraíba, quando 2526 de uma amostra total de 10472 indivíduos foram aleatoriamente selecionados, em 2 bairros, com incidência elevada para a realização da sorologia 95,0% dos indivíduos positivos e 17,1% dos negativos foram selecionados para realização do exame físico e investigação diagnóstica completa. A prevalência de hanseníase foi de 19 casos em 834 (2,3%) examinados. As proteínas de fusão LID-1 e PADL tiveram uma sensibilidade alta no inquérito de campo, respectivamente 89% e 87%, sendo apenas negativos em dois indivíduos com a forma paucibacilar (PB). A especificidade foi baixa, 42% e 38% respectivamente. O valor preditivo positivo (VPP) para LID-1 e PADL de 3,5% e 3,7% e negativos (VPN) de 99% (ambos), respectivamente. Estes resultados indicam que os antígenos recombinantes LID-1 e PADL são eficientes em excluir a hanseníase nos indivíduos que forem negativos para os testes em questão; têm, porém, valor baixo de predição da doença, no município de Cajazeiras PB/Brasil. O acompanhamento desses indivíduos soropositivos poderia esclarecer o valor de predição de LID-1 e PADL.

.

Palavras – chave: Hanseníase. Sorologia. Diagnóstico.

ABSTRACT

SCREENING LEPROSY AND *MYCOBACTERIUM LEPRAE* INFECTION USING LID-1 AND PADL RECOMBINANT ANTIGENS

Leprosy is an infectious disease, caused by *Mycobacterium leprae*, which affects in general skin and peripheral nerves. Despite the increasing use of multidrug therapy, the number of new cases remains constant in many countries. One of the most serious problems to the disease elimination is the absence of elevated sensitivity and specificity tests. This study had as goal to carry to screening leprosy and *Mycobacterium leprae* using LID-1 (Leprosy IDRI Diagnostic-1), and PADL (Protein Advances for the Diagnosis of Leprosy) recombinant antigens for the diagnosis of leprosy in a hyperendemic municipality, using a population-based. The study was conducted in the municipality of Cajazeiras/Paraíba, when 2526 of a total sample of 10472 individuals were randomly selected from two neighborhoods with permanent high incidence to perform serology, and 95.0% of positive subjects and 17.1% of the negatives were selected to perform physical examination and complete diagnostic investigation. The prevalence of leprosy was 19 in 834 cases (2.3%) tested. The fusion proteins LID-1 and PADL had a high sensitivity in the field survey, respectively 89% and 87%, being negative only in two subjects with paucibacillar form. The specificity was low, 42% and 38%, respectively. The positive predictive value (PPV) for LID-1 and PADL were 3.5% and 3.7% respectively and negative (PVN) 99% (in both test). These results indicate that the recombinant antigens LID-1 and PADL are efficient to exclude leprosy in negative individuals, however low value for predicting disease in Cajazeiras/Paraíba/Brazil municipality. The follow-up of those seropositive subjects could clarify the prediction value of LID-1 and PADL.

Keywords: Leprosy. Diagnosis. Serology. *Mycobacterium leprae*.

2 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infecciosa, granulomatosa, causada pelo *Mycobacterium leprae* que afeta a pele e os nervos periféricos, e se constitui a principal causa de incapacidade física. A neuropatia periférica é sua principal manifestação, responde pelo potencial da doença, em causar incapacidades e deformidades físicas. No Brasil, a hanseníase continua sendo um problema de saúde pública, com 34.894 novos casos registrados em 2010^(*).

O diagnóstico da hanseníase é baseado no aparecimento de manifestações clínicas, na detecção microscópica em esfregaços de BAAR e histopatologia. Os métodos de diagnóstico para a hanseníase com base em sequências *Mycobacterium leprae* de DNA têm sido pesquisados. Esses métodos são difíceis de ser utilizados em países em desenvolvimento, pois requerem máquinas e materiais de alto custo e técnicos especializados, sendo, portanto, mais fácil utilizar provas sorológicas. Em países onde a hanseníase é endêmica, o diagnóstico ainda se baseia em manifestações clínicas.

Os testes disponíveis ainda estão em fase de pesquisas e não apresentam sensibilidade e especificidade necessárias para servir como métodos diagnósticos capazes de detectar e quantificar o *Mycobacterium leprae* antes do aparecimento da doença, bem como de apresentar uma acurácia suficiente para substituir o método da bacteriologia ou da biopsia da lesão.

Uma ferramenta empregada para a abordagem da detecção precoce da infecção pelo *Mycobacterium leprae*, é o teste sorológico. Para isso, estão sendo realizados testes para detectar anticorpos contra o glicolípido fenólico 1 (PLG-1) do *Mycobacterium leprae*, porém, nenhum desses testes têm um grau satisfatório de sensibilidade e especificidade para a aplicação de diagnóstico. Na sua maioria, esses testes são aplicáveis às formas multibacilares com soropositividade de 80% a 100%, tendo pouca importância diagnóstica para os pacientes com as formas paucibacilares com soropositividade de 30% a 60%^(**).

(*) World Health Organization. Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to Leprosy: plan period:2011-2015. Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília: Organização Mundial de Saúde, 2010.

(**) Spencer JS, Kim HWV, Wheat H, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV. Analysis of antibody responses to *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I, lipoarabinomannan, and recombinant proteins to define disease subtype-specific antigenic profiles in leprosy. *Clin Vaccine Immunol*, 2011; 18(2): 260- 7.

Após a conclusão do sequenciamento do genoma do *Mycobacterium leprae* por meio da biologia molecular e bioinformática, vários antígenos de proteínas do *Mycobacterium leprae* que são reconhecidos por anticorpos de pacientes de hanseníase, estão sendo investigados. Os antígenos de proteínas recombinantes investigados durante a última década, podem ser utilizados para rastrear os indivíduos saudáveis que estejam em risco de desenvolver a doença ou estão apresentando possíveis sinais precoces da hanseníase e a capacidade de acompanhar a eficácia do tratamento com Terapia de Múltiplas Drogas (MDT)^(***).

Pesquisadores do consórcio IDEAL (Iniciativa para Ensaio Diagnóstico e Epidemiológico para Hanseníase) desenvolveram estudos de seleção de antígenos proteicos para o diagnóstico sorológico precoce da hanseníase em vários países, tendo demonstrado a capacidade da LID- 1 (Leprosy IDRI Diagnostic- 1), proteína de fusão (ML 0405 e ML 2331), em diagnosticar pacientes de hanseníase ^(****). Para melhor avaliar o potencial diagnóstico da nova proteína de fusão LID-1, é importante testá-la em estudos de base populacional. Esses pesquisadores, além de produzirem e validarem a reatividade da PADL (proteína avançada para o diagnóstico de hanseníase) (ML 0405, ML 2331, ML 2055, ML 04011 e ML 0091), também demonstraram fornecer um diagnóstico preciso da hanseníase MB. Novas pesquisas, entretanto, são necessárias para determinar se a PADL pode detectar a infecção no início da doença^(*****). Até o presente momento, não existe nenhum teste sorológico para o diagnóstico precoce de hanseníase, estudos de antígenos que induzam respostas mediadas por células são considerados área prioritária de pesquisa em países endêmicos e não endêmicos. Neste contexto, este estudo tem por objetivo realizar o rastreamento e infecção do *Mycobacterium leprae* utilizando os antígenos recombinantes LID-1 e PADL para o diagnóstico da hanseníase em um município hiperendêmico.

^(***) Geluk A, Duthie MS, Spencer JS. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. *Lepr Rev* 2011; 82, 402 – 421.

^(****) Duthie MS, Goto W, Ireton GC et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol*, 2007; 14: 1400 – 1408.

^(*****) Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath RM, Ito L, et al. Rational Design and Evaluation of a Multiepitope Chimeric Fusion Protein with the Potential for Leprosy Diagnosis. *Clin Vaccine Immunol*, 2010; 17 (2): 298–303.

3 OBJETIVOS

PRINCIPAL:

Realizar o rastreamento da hanseníase e infecção do *Mycobacterium leprae*, utilizando os antígenos recombinantes LID-1 e PADL em um município hiperendêmico.

SECUNDÁRIOS:

Determinar o perfil dos indivíduos selecionados para o rastreamento do *Mycobacterium leprae*, utilizando os antígenos recombinantes LID-1 e PADL;

Determinar a prevalência da hanseníase na amostra examinada, utilizando os antígenos recombinantes LID-1 e PADL;

Determinar a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN dos antígenos recombinantes LID-1 e PADL.

4. ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1

TÍTULO: Ferramentas no Diagnóstico da Hanseníase: o convencional e as inovações

PERIÓDICO: Revista Brasileira de Medicina

SITUAÇÃO: Publicado

Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa, crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta, em geral, a pele e os nervos periféricos, embora possua um amplo espectro de manifestações clínicas¹. A neuropatia periférica é sua principal manifestação e responde pelo potencial da doença em causar incapacidades e deformidades físicas².

A Organização Mundial da Saúde (OMS), na estratégia de controle da hanseníase na detecção e tratamento, tem resultado numa redução acentuada do número de casos registrados em todo o mundo, nos últimos 20 anos. Apesar dos esforços, a detecção de casos novos, a cada ano, permanece relativamente estável. Assim, a doença ainda representa um problema de saúde pública³.

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, depende do reconhecimento dos sinais da doença, portanto só é possível quando a doença se manifestou. A Organização Mundial da Saúde estabeleceu critérios de diagnóstico, considerando-se a pessoa que apresenta um ou mais dos seguintes sinais cardinais: aparecimento de manchas hipopigmentadas ou avermelhadas com alterações de sensibilidade; com pesquisa de bacilos em esfregaço de linfa (baciloscopia) e exame histopatológico das lesões cutâneas¹. Nos países em desenvolvimento, os sinais clínicos são as principais características para o diagnóstico da hanseníase⁴.

Com base na resposta imunológica do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*, a hanseníase foi classificada em cinco formas: lepra lepromatosa (LL), borderline lepromatosa (BL), meados de borderline (BB), borderline tuberculóide (BT) e tuberculóide (TT)⁵. Para fins de tratamento, os pacientes foram identificados como multibacilares (MB: LL, BL, BB e alguns BT) ou paucibacilares (PB: TT e alguns BT).

Os pacientes PB têm uma ou poucas lesões de pele e índice baciloscópico (IB) ausente ou baixo, demonstram imunidade mediada por células específicas contra o *Mycobacterium leprae*, mas têm títulos baixos ou ausentes de anticorpos específicos de *Mycobacterium leprae* dermatopatologia granulomatosa. Entretanto, pacientes MB que têm múltiplas lesões cutâneas simétricas e IB alto demonstram ausência de imunidade mediada por células específicas contra o *Mycobacterium leprae*, porém altos títulos de anticorpos *Mycobacterium leprae* e dermatopatologia desprovida de linfócitos funcionais⁶.

O cultivo do *Mycobacterium leprae*, *in vitro*, ainda não é possível, o que representa um obstáculo na investigação de novos testes diagnósticos para hanseníase e tornam difícil a produção de quantidades suficientes de antígenos altamente purificados, como ferramentas de investigação. Progressos significativos na compreensão da estrutura molecular de *Myco-*

A Organização Mundial da Saúde (OMS), na estratégia de controle da hanseníase na detecção e tratamento, tem resultado numa redução acentuada do número de casos registrados em todo o mundo, nos últimos 20 anos. Apesar dos esforços, a detecção de casos novos, a cada ano, permanece relativamente estável.

bacterium leprae foram alcançados, incluindo a realização de sequenciação do genoma do *Mycobacterium leprae*, o que tornou mais fácil selecionar e expressar antígenos recombinantes de potencial valor diagnóstico⁷.

Além dos métodos de diagnósticos convencionais descritos, a sorologia e reação da cadeia de polimerase (PCR) têm sido utilizadas para o diagnóstico da hanseníase, apesar de nenhum destes testes mostrarem sensibilidade e especificidade como ferramentas de diagnóstico de rotina. As vantagens principais da sorologia e do PCR é que se tem uma resposta rápida e é possível utilizar amostras biológicas sem a necessidade de isolamento ou crescimento em cultura⁴. Em vista disso, fazem-se necessárias ferramentas específicas para se diagnosticar a infecção pelo *Mycobacterium leprae*, antes mesmo do aparecimento dos sinais clínicos. Mediante o exposto, esta pesquisa buscou apresentar as ferramentas convencionais e as inovações para o diagnóstico da hanseníase.

Ferramentas convencionais no diagnóstico da hanseníase

Diagnóstico clínico

Uma das ferramentas para elucidar a hanseníase é o diagnóstico clínico, mediante o aparecimento de lesões cutâneas que, em muitos casos, ocorrem após lesão do nervo. Na presença de uma lesão suspeita, impõe-se a realização de uma anamnese completa, com história clínica e avaliação dermatoneurológica. Para confirmação do diagnóstico clínico é preciso que se verifique a existência de um distúrbio de sensibili-

dade de uma determinada área da pele ou de uma mancha. Esse distúrbio de sensibilidade se caracteriza pela ausência ou diminuição das sensibilidades térmica, dolorosa e tátil. As ferramentas laboratoriais, como pesquisa de BAAR (baciloscopia) e a biópsia, podem auxiliar no diagnóstico clínico em formas avançadas da hanseníase⁸.

Adotar apenas um dos sinais cardinais como critério para o diagnóstico da hanseníase, conforme preconiza a OMS, pode apresentar algumas limitações, pois nem todas as lesões apresentam hipopigmentação óbvias ou eritematosas, além de que, nas formas multibacilares, nem sempre as lesões são anestésicas. Os espessamentos dos nervos aparecem mais tarde do que as lesões de pele e são vistos mais comumente nas formas multibacilares. Embora altamente específico, a detecção microscópica de bacilos-ácidos resistentes tem baixa sensibilidade⁹.

Na hanseníase indeterminada o diagnóstico é eminentemente clínico, hipoestésica manifesta ou não, por lesão visível, de forma inicial e transitória, podendo evoluir espontaneamente para a cura ou mesmo involuir, ressurgindo para outras formas da doença, sem comprometimento dos troncos nervosos. Na fase precoce da hanseníase a mancha pode apresentar apenas distúrbio da sensibilidade térmica e com a evolução é que as três sensibilidades térmica, dolorosa e tátil estariam alteradas. A avaliação sensitiva motora pode ser prejudicada em crianças; por isso, pode ser feita por meio da prova da histamina e da pilocarpina⁸.

Na hanseníase tuberculoide as lesões se apresentam sob a forma de uma ou poucas placas bem delimitadas, com distúrbios de sensibilidade, na maioria das vezes bem acentuados; comprometimento dos troncos nervosos em pequeno número, intenso e localizados.

Na hanseníase dimorfa a clínica pode sugerir o diagnóstico por apresentar múltiplas lesões delimitadas, lesões foveolares, infiltração, principalmente, quando houver sinais de comprometimento dos troncos nervosos.

Na hanseníase virchowiana o quadro característico é infiltração difusa da pele com inúmeras manchas, placas e nódulos eritematosos, comprometimento de órgãos internos, como olhos, testículos, lífonodos, fígado e baço, apresentam discretos distúrbios de sensibilidade, sendo evidente o comprometimento dos troncos nervosos, em geral, em fases tardias da moléstia⁸.

Diagnóstico baciloscópio

A baciloscopia é um exame complementar e tem importância no diagnóstico e na classificação clínica da hanseníase. O exame baciloscópio deve ser realizado em todos os pacientes com suspeita clínica da hanseníase^{8,10}. É de fácil

execução e baixo custo. Porém, necessita de laboratório e profissionais habilitados, que nem sempre estão presentes na atenção básica de saúde. O raspado dérmico é coletado nas lesões suspeitas, nos lóbulos e nos cotovelos. A baciloscopia de raspado intradérmico tem alta especificidade, mas baixa sensibilidade. Cerca de 70% de todos os pacientes com hanseníase têm baciloscopia negativa¹¹. A baciloscopia é negativa nas formas PB e em alguns pacientes MB⁸, sendo que baciloscopia positiva classifica o caso como MB, independentemente, do número de lesões cutâneas¹².

O IB significa a escala logarítmica de cada esfregaço examinado, constituindo a média dos índices dos esfregaços que vai de 0 a 6+⁶. As pesquisas mostram que o resultado do índice baciloscópio está condicionado a numerosas variáveis que dificultam a sua padronização como: a profundidade do corte, quantidade do tecido retirado, tamanho e espessura do esfregaço⁸.

Diagnóstico histopatológico

Embora alguns autores considerem que o exame histopatológico seja o “padrão-ouro” para o diagnóstico da hanseníase, o método também é falho⁽¹³⁾. Em um número significativo de casos, as biópsias são falso-negativas. Na prática, uma correlação clínica e histológica pode ser necessária para o diagnóstico¹⁴. A biópsia é importante para o diagnóstico histológico, classificação e investigação de inoculação em coxim de camundongos¹⁵. A biópsia de pele é obtida a partir de uma lesão ativa, fixada em formol tamponado neutro, embebida em parafina e examinada por profissional especializado (patologista)¹⁶. Os cortes histológicos são corados pela hematoxilina-eosina e pelo método de Fite-Faraco. Eventualmente, pode-se usar a coloração de Sudão III para a pesquisa de lipídio¹⁷.

Nas lesões tuberculoide, em que o bacilo pode ser raro e difícil de se encontrar, o diagnóstico diferencial da resposta granulomatosa inclui tuberculose cutânea, sarcoidose e granuloma anular. Quando em uma lesão hipocrômica ou em área cutânea apenas com perturbação de sensibilidade, os procedimentos clínicos não forem elucidativos, há necessidade da biópsia. Nos infiltrados de hanseníase lepromatosa polar os bacilos são facilmente demonstrados, mas o cuidado deve ser para identificar bacilos dentro dos nervos^{16,18}. A confirmação do diagnóstico de hanseníase neural pura (HNP) exige a presença comprovada do *Mycobacterium leprae* em uma biópsia de qualquer nervo sensorial afetado¹⁹.

Diagnóstico pelo teste cutâneo

A hanseníase é caracterizada por resposta imunecelular (RIC) e a hipersensibilidade do tipo tardia é considerada uma

manifestação dessa resposta. Desde a descrição do teste cutâneo lepromina (Mitsuda), em 1919, várias tentativas foram feitas para desenvolver testes cutâneos para o diagnóstico da hanseníase²⁰. O teste de Mitsuda que é, frequentemente, a causa de expectativas de diagnóstico da hanseníase, fornece uma medida da capacidade do indivíduo de montar uma resposta granulomatosa a este organismo, mas que não reflete a infecção nem mesmo por exposição ao *Mycobacterium leprae*. A resposta à lepromina não é específica da hanseníase, pois pessoas nunca expostas ao *Mycobacterium leprae* podem desenvolver uma reação positiva à lepromina¹⁶.

O teste de lepromina provoca uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia e tem sido utilizado para a classificação imunológica das formas polares da hanseníase²¹. Atualmente, os três tipos de antígenos utilizados são: 1) o integral, que é uma suspensão obtida a partir de bacilos de Hansen extraídos de hansenomas oriundos de pacientes multibacilares²², mortos pelo calor e mantidos em solução isotônica de cloreto de sódio. Essa suspensão deve conter entre 40 e 160 milhões de bacilos por mililitro²³; 2) o bacilar, composto de bacilos sem os restos teciduais; e 3) o proteico, que utiliza proteínas do citosol, da membrana ou de proteínas solúveis da parede do *Mycobacterium leprae*²⁰.

A administração intradérmica de 0,1 ml de uma suspensão estéril de bacilos de Hansen mortos pelo calor (mitsudina) pode provocar uma reação tardia (reação de Mitsuda), lida, macroscopicamente, depois de quatro semanas. Os critérios adotados para a leitura foram formulados em 1948, no Congresso Internacional de Tóquio. Em 1953, no VI Congresso Internacional em Madri, os pesquisadores estabeleceram os critérios de classificação da hanseníase: definindo pacientes tuberculoides, como Mitsuda positivos e os pacientes virchowianos negativos. No grupo indeterminado a intradermorreação varia de acordo com a capacidade imune do indivíduo⁹.

Nenhum teste cutâneo que permite o diagnóstico da hanseníase tem sido desenvolvido atualmente. Estudos estão em curso para tentar identificar os antígenos de proteínas que possam ser úteis como reagentes de diagnóstico¹⁶.

Propostas de ferramentas inovadoras no diagnóstico da hanseníase

Uma ferramenta para a abordagem da detecção precoce da infecção pelo *Mycobacterium leprae* é o teste sorológico. Após a conclusão recente do sequenciamento do genoma do *Mycobacterium leprae* por meio da biologia molecular e bioinformática, instrumentos revelaram antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* que podem ser utilizados para o

diagnóstico de hanseníase²²⁻²⁴. A identificação da hanseníase com base em uma resposta de antígenos específicos, preferencialmente antes do início dos sinais, poderia ter um impacto sobre a evolução clínica da doença²⁵.

O glicolípido fenólico-I (PGL-I) foi um dos primeiros antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* a ser isolado e caracterizado²⁶, o principal glicolípido antigênico do bacilo, molécula composta por um trissacarídeo único, o 3,6-di-O-metila- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 4)-2,3-di-O-metila- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-3-O-metila- α -L-ramnopiranosil²⁷. A partir da identificação do PGL-I outros neoglicolípidios foram produzidos: monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo-BSA (D-BSA)²⁸, dissacarídeo natural-octil-BSA (ND-O-BSA)²⁹, trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA)³⁰ e o dissacarídeo natural-octil-HSA (ND-O-HSA)²⁹.

As técnicas usadas para desenvolver os testes incluem o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)³¹, o teste de hemaglutinação passiva (PHA)³², o teste de aglutinação com partícula de gelatina (MLPA)³³, dipstick³⁴ e o teste de fluxo lateral³⁵.

A técnica mais utilizada é o ELISA³⁶ para detectar a presença de anticorpos contra o glicolípido fenólico - PGL-I, específico do *Mycobacterium leprae*, sobretudo IgM³⁷. O ELISA é uma técnica *in-house* bem estabelecida²⁸. Mesmo sendo difícil de padronizar, o baixo custo do ELISA e resultados quantitativos fazem com que seja um teste único, considerado o preferido para estudos epidemiológicos de grande escala e acompanhamento dos pacientes²⁷.

As vantagens do ELISA são: a ampla disponibilidade dos equipamentos necessários, visto que a técnica é quase universalmente aplicável, fácil separação dos estágios sólido e líquido e o fato de que não é preciso marcar os componentes específicos do *Mycobacterium leprae* utilizados no teste (antígeno ou anticorpo). Mesmo assim, o ELISA é uma técnica laboriosa e limitações existem, devido às diferenças no preparo e concentração do antígeno, soluções tamponadas, procedimentos de lavagem, diluição de soro e tipo de substrato usado na técnica²⁷.

Utilizando o PGL-I nativo e seus derivados semissintéticos, diversos ensaios sorológicos foram desenvolvidos para detectar a presença de anticorpos das classes de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA³⁸. A sorologia anti PGL-I tem menor relevância para o diagnóstico da hanseníase PB. Estes pacientes têm IB baixo ou ausente e são caracterizados por resposta imune celular, em vez de resposta imune humoral. Em áreas endêmicas, uma proporção significativa de indivíduos saudáveis pode ter sorologia anti PGL-I positiva³⁹.

Os testes sorológicos, juntamente, com informações clínicas e laboratoriais são úteis no diagnóstico da hanseníase, na

classificação dos pacientes MB e PB, no tratamento e na vigilância epidemiológica de contatos de pacientes com hanseníase e não contatos, em áreas endêmicas que possuem elevado risco de adoecimento por formas graves da doença⁴⁰.

Estudos de revisão sistemática indicam que a utilização da sorologia como ferramenta para classificação reduziria o número de pacientes tratados como MB. A contagem do número de lesões de pele é uma ferramenta operacional adequada, porém não bem aceita pelos profissionais de saúde. Foi constatado que os contatos apresentaram soropositividade de até 18,4%; os menores e maiores valores foram encontrados entre os contatos de pacientes PB e MB, respectivamente⁴¹.

A Organização Mundial da Saúde, na estratégia de controle da hanseníase, tem resultado em uma redução acentuada do número de casos registrados em todo o mundo, nos últimos 20 anos. Apesar de esforços, a detecção de casos novos, a cada ano, permanece relativamente estável, em regiões endêmicas.

No tratamento da hanseníase os níveis de anticorpos diminuem na maioria dos pacientes, fato relacionado com a diminuição do IB^{42,43}. O declínio varia de 25% a 50% por ano, podendo permanecer positivo durante anos após a cura. A sorologia não pode distinguir entre infecção passada e atual; por isso, não pode ser usada como ferramenta única na distinção entre infecção clínica e subclínica³⁹.

Na era pós-genômica os resultados dos estudos sorológicos com várias proteínas recombinantes do *Mycobacterium leprae* refletem o espectro da hanseníase: altos títulos de anticorpos no polo lepromatoso e baixos níveis no polo tuberculoide⁴⁴. Vários grupos de pesquisas examinaram cerca de 200 proteínas recombinantes, que podem ser utilizadas para rastrear os indivíduos saudáveis, que estejam em risco de desenvolver a doença ou apresentem possíveis sinais precoces da hanseníase e sugerindo que pode ser útil para monito-

rar MDT. Apesar do progresso, existem questões quanto à sensibilidade e especificidade destes testes, quando os antígenos são examinados por respostas mediadas por células⁴⁵. Estes novos antígenos proteicos representam candidatos para o desenvolvimento de melhores testes sorológicos com sensibilidade e especificidade melhorada para o diagnóstico da hanseníase, classificação e controle MDT⁴⁶.

Nos últimos 15 anos está sendo desenvolvida a técnica da PCR, método que vem revolucionando a prática da Biologia Molecular, usada para amplificar pequenas quantidades de DNA ou RNA. Amostras clínicas da pele, linfa, sangue, pele e biópsia de nervo, bulbos capilares e secreção nasal podem ser utilizadas para PCR, mediadas por detecção de *Mycobacterium leprae*⁴⁷.

Os primeiros pesquisadores a utilizar a PCR no estudo do *Mycobacterium leprae*, demonstrando boa especificidade do gene ao utilizar a proteína de 18 KDa do *Mycobacterium leprae*, quando foi comparada às outras micobactérias⁴⁸. Assim, a PCR para o método de identificação do DNA, que codifica proteínas *Mycobacterium leprae*, inclui o antígeno-36 kDa⁴⁹, 18 kDa⁵⁰, 65 kDa⁵¹, Ag 85B⁵², 16S rRNA⁵³ e as sequências repetitivas (RLEP)⁵⁴.

A avaliação extensiva dos testes em estudos de campo, baseados em PCR e técnicas de transcrição reversa-PCR-based tem mostrado uma especificidade de 100% e uma sensibilidade variando de 34% a 80% em pacientes com formas PB da hanseníase, para uma maior de 90% em pacientes com formas MB. Por outro lado, ensaios baseados em PCR têm permitido a sua execução em laboratórios de referência e podem proporcionar um excelente complemento para o diagnóstico clínico e histopatológico da hanseníase¹⁶.

Considerações finais

A Organização Mundial da Saúde, na estratégia de controle da hanseníase, tem resultado em uma redução acentuada do número de casos registrados em todo o mundo, nos últimos 20 anos. Apesar de esforços, a detecção de casos novos, a cada ano, permanece relativamente estável, em regiões endêmicas. Assim, a doença ainda representa um problema de saúde pública.

Os pacientes de hanseníase são diagnosticados mediante critérios clínicos, presença de BAAR ou cortes histológicos. Estes métodos utilizados na rotina no diagnóstico do *Mycobacterium leprae*, em particular nos pacientes com hanseníase indeterminada, no final do espectro tuberculoide, têm uma baixa sensibilidade para a demonstração do BAAR. O diagnóstico histopatológico, apesar de ter uma sensibilidade pouco maior e evidenciar lesões neurais importantes para a

definição do tratamento, por ter relativamente uma sensibilidade falha, ser dispendioso e demorado. Evidentemente uma correlação clínica e histológica pode ser necessária e fidedigna para o diagnóstico.

Testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos específicos são em grande parte positivos em pacientes MB, que apresentam cargas bacilares elevadas, mas têm uma sensibilidade insuficiente para a definição diagnóstica nos pacientes PB. Assim, espera-se que após a determinação do genoma do *Mycobacterium leprae*, cerca de 200 proteínas recombinantes sejam descobertas e sejam relevantes para rastreamento de indivíduos saudáveis, que estejam em risco de desenvolver a doença ou estejam apresentando sinais precoces. A esse respeito, ensaios baseados em PCR têm permitido a sua execução em laboratórios de referência e podem proporcionar um excelente complemento para o diagnóstico clínico e histopatológico da hanseníase.

Existe ainda muito espaço para novos testes diagnósticos que seriam necessários para a distinção entre indivíduos expostos/infectados e os que podem ter uma evolução ativa para a doença, permitindo um diagnóstico precoce e, assim, interrompendo a cadeia de transmissão da hanseníase.

Referências bibliográficas

1. World Health Organization. Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to Leprosy: plan period: 2011-2015. Organização Pan-Americana da Saúde, Brasília: Organização Mundial da Saúde, 2010.
2. Walker, SL, Lockwood, DNJ. Leprosy. Clinics in Dermatology, v. 25, n. 2, p. 165-172, Mar-Apr. 2007.
3. Duthie MS, Truman RW, Goto W, Donnell JO, Hay MN, Spencer JS. Visão para o diagnóstico precoce da hanseníase por meio de análise das respostas de anticorpos em desenvolvimento de *Mycobacterium leprae* de tatus-infectados. Clin. Vaccine Immunol, 2011; 18 (2): 254-259.
4. Bang PD, Suzuki K, Phuong LT, Chu TM, Ishii N, Khang TH. Avaliação da reação em cadeia de polimerase baseada detecção de *Mycobacterium leprae* para o diagnóstico da lepra. Journal of Dermatology, 2009; 36: 269-276.
5. Scollard, DM. Classification of leprosy: a full color spectrum, or black and white? Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis, v. 72, p. 166-168, 2004.
6. Ridley DS, Jopling WJ. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. Int. J. Lepr. Other. Mycobact. Dis, 1966; 34: 255-273.
7. Cole STK, Eigmeier J, Parkhill KD, James NR, Thompson PR, Weeler N, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature, 2001; 409:1007-1011.
8. Opromolla DVA. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.
9. Oliveira MLW, Cavalière FA, Maceira JMP, Buher-Sekula S. O uso da sorologia como ferramenta adicional no apoio ao diagnóstico de casos difíceis de hanseníase multibacilar: lições de uma unidade de referência. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 2006; 41(2):27-33.
10. Waters MFR. To smear or not to smear? Leprosy Review, 2002; 73: 211-214, 2002.
11. Ustianowski AP, Lockwood DNJ. Leprosy current diagnostic and treatment approach Current. Opinion Infectious Disease, 2003; 16: 421-427.

Summary

Leprosy is an infectious, chronic disease, caused by the Mycobacterium leprae, which affects, in general, the skin and the peripheral nerves. The peripheral neuropathy is its main manifestation and responds for the potential of the disease in causing incapacities and physical deformities. Leprosy represents a serious problem in public health, since in endemic regions the detection of new cases remains relatively stable. This research has aimed to present the conventional tools and the innovations for the diagnosis of leprosy. It is a review of literature. Besides the clinical diagnosis, there are other conventional tools for the elucidation of leprosy, such as: bacilloscopy, skin test and the histopathological test. One of the innovative tools in the diagnosis of leprosy is the serological test, based on the detection of specific antibodies they are, universally, positive in MB patients, but they have an insufficient sensitivity for the diagnostic definition in PB patients. Another innovation is the PCR technique, method which is revolutionizing the Molecular Biology practice, used for amplifying small quantities of DNA or RNA. There are still many spaces for new diagnostic tests which would be necessary for the distinction between exposed/infectected individuals and the ones who may have an active evolution for the disease, allowing a precocious diagnosis, thus, interrupting its transmission chain.

12. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção básica. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Hanseníase: atividades de controle e procedimentos. Brasília, 2001.
13. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. The Lancet., 2004; 363:1209-1219.
14. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. J. Acad. Am. Dermatol, 2004; 51: 417- 426.
15. Piris A, Lobo AZ, Moschella SL. Global dermatopathology: Hansen's disease – current concepts and challenges. Journal of Cutaneous Pathology, 2010; 37(1):125-136.
16. Scollard DM, Adams LB, Gillis JL, Krahenbuhl RW, Truman D, Williams L. The continuing challenges of leprosy. Clin. Microbiol, 2006; 19(2):338-381.
17. Sampaio SP, Rivitti EA. Hanseníase. São Paulo; Artes Médicas, cap. 40: Hanseníase, 2002.
18. Lockwood DN. Leprosy - a changing picture but a continuing challenge. Tropical doctor, 2005; 35: 65-67.
19. Antunes SLG, Chimelli L, Jardim MR, Vital RT, Nery JAC, Real-Corte S et al. Histopathological examination of nerve samples from pure neural leprosy patients: obtaining maximum information to improve diagnostic efficiency. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 2012; 107(2):246-253.
20. Brennan, P.J. Skin test development in leprosy: progress with first generation skin test antigens, and an approach to the second generation. Lepr.

Ferramentas no diagnóstico da hanseníase: o convencional e as inovações

- Review, 2000; 71: S50-4.
21. Garcia, AP. On the polar classification of leprosy (editorial). Act. dermo-sifiliogr. Madrid. 1976; 67:115-8.
 22. Davey TF, Rees RJW. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. Lepr. Review., 1974; 45:121-34.
 23. Beiguelman B. Genética e hanseníase. Ciênc. Saúde Coletiva, 2002; 7(1).
 24. Reece ST, Ireton G, Monhamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R, et al. ML O4005 and ML 2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diagnosis of leprosy. Clinical and vaccine immunology, 2006; 13:333-340.
 25. Duthie MS, Ireton GC, Kanaujia GV, Goto W, Liang H, Bhatia A. Selection of Antigens and Development of Prototype Tests for Point-of-Care Leprosy Diagnosis. Clinical and vaccine immunology, 2008; 15:1590-1597.
 26. Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr. Outros Mycobact. Dis, 1980; 48:382-387, 1980.
 27. Buher-Sekula S. Sorologia PGL-I na hanseníase. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 2008; 41(2):3-5.
 28. Gigg J, Gigg R, Payne SC. The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1—4)-O-(2,3-di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1—2)-3-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of the major serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. Chemistry and Physics of Lipids, 1985; 38: 299-307.
 29. Chatterjee D, Cho SN, Brennan PJ, Aspinall, GO. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1—4)-O-(2,3-di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1—9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin—the leprosy-specific, natural disaccharide-octyl-neoglycoprotein. Carbohydrate Research, 1986; 156: 39-56.
 30. Fujiwara T, Hunter SW, Cho SN, Aspinall GO, Brennan PJ. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. Infection and Immunity, 1984; 43: 245-252.
 31. Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R. Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. Clinical and Experimental Immunology, 1986; 64: 476-483.
 32. Petchlai B, Khupulsu, K, Hiranras S, Sampatavanich S, Sampoonachot P, Leelarusamee A. A passive hemagglutination test for leprosy using a synthetic disaccharide antigen. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1988; 56: 255-258.
 33. Izumi S, Fujiwara T, Ikeda M, Nishimura Y, Sugiyama K, Kawatsu K. Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field. Journal Clinical of Microbiology, 1990; 28: 525-529.
 34. Buher-Sekula S, Hamerline FF, Out TA, Bordewijk LG, Klatser PR. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera. Journal of Immunological Methods, 2000; 238: 55-58.
 35. Saunderson P, Groenen G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. Leprosy Review, 2000; 71:34-42.
 36. Cho SN, Yanagibara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. Infection and Immunity, 1983; 41:1077-1083.
 37. Silva CR, Lyon S, Aros R, Lyon AC, Grossi FMA, Lyon SH, et al. Comportamento dos testes sorológicos ML Flow e ELISA (PGL-1) em áreas endêmicas e não endêmicas de hanseníase. Rev. Soc. Bras. de Med. Trop, 2008; 41(2):19-22.
 38. Buher-Sekula S, Vissche J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L. The ML flow test as point o care for leprosy control programmes: potential effects on classifications of leprosy patients. Lepr. Review, 2007; 78: 70-79.
 39. Oskam L, Slim E, Buher-Sekula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. Leprosy Review, 74: 196-205. 2003.
 40. Fabri ACOC. Prevalência de infecção pelo *Mycobacterium leprae* na população e da microrregião de Almenara- Minas Gerais. 2011. 22f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de enfermagem, UFMG, Belo Horizonte, 2011.
 41. Moura RS, Calado KL, Oliveira, ML, Bühner-Sékula, S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. v. 41 (2) Uberaba 2008.
 42. Buher-Sekula S, Cunha MG, Foss NT, Oskam L, Faber WR, Klatser PR. 2001.Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. Tropical Medicine & International Health, 6:317-323
 43. Buher-Sekula S, Smits L, Gussenhoven JL, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients identification of contacts with high risk of developing leprosy. J. Clin. Microbiol, 2003; 41:1991-1995
 44. Stefani MM. Desafios na era pós-genômica para desenvolvimento de testes laboratoriais. Rev. Soc. Bras. Med. Trop, 2008; 41(2).
 45. Geluk A, Duthie MS, Spencer J. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *Mycobacterium leprae* exposure infection and leprosy disease. Lep. Rev, 2011; 82: 402 -421.
 46. Hungria EM, Oliveira RM, Souza ALOM, Costa MB, Souza NB, Silva EA, Moreno FRV, Nogueira MES, Costa MRVN, Silva SMUR; Bühner-Sékula S, Steven RG, Duthie MS, Stefani MM. Sororeatividade ao novo *Mycobacterium leprae* antígenos de proteína em diferentes regiões endêmicas hanseníase no Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz v.107 Supl.1 Rio de Janeiro dezembro 2012.
 47. Santos AR, Miranda AB, Sarno EM, Suffys PN, Degrave WM. Uso de PCR mediada por amplificação de *Mycobacterium leprae* DNA em diferentes tipos de amostras clínicas para o diagnóstico da lepra. J Med Microbiol, 1993; 39:298-304.
 48. Williams, DL, GILLS, TP, Booth, RJ, Looker, D, WATSON, JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae*. J Infection Dis, 1990; 162:193-200.
 49. Kampirapap K, Singtam N, Klatser PR. Wiriawipart amplificação de DNA S, para detecção de hanseníase e avaliação da eficácia de lepra quimioterapia. Int J Lepr Other Mycobact Dis, 1998; 66: 16-21.
 50. Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the states. Am. J. Clin. Pthol, 1998;109:642-646.
 51. Plikaytis BB, Gelber RH, Shinnick TM, A detecção rápida e sensível de *Mycobacterium leprae*, utilizando um iniciador nested-ensaio de amplificação gênica. J Clin Microbiol., 1990; 28:1913-1917.
 52. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, et al. Avaliação da PCR em tempo real e convencionais de segmentação complexos 85 genes para a detecção de *Mycobacterium leprae* DNA em amostras de pele de biópsias de pacientes com diagnóstico de lepra. J Clin Microbiol, 2006; 44:3154-3159.
 53. Rudeeaneksin J, Srisungngam S, Sawanpanyalert PT, Sittiwakin T, Likansakul S, et al. Light Cycler PCR em tempo real para a rápida detecção e quantificação de *Mycobacterium leprae* em amostras de pele. Immunol Med Microbiol, 2008; 54:263-270.
 54. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R. et al. Determinação molecular de *Mycobacterium leprae* viabilidade de utilização de PCR em tempo real. J Clin Microbiol, 2009; 47:2124-2130.

4.2 ARTIGO 2

TÍTULO: Identifying the reasons why these contacts do not go to the USF for the dermato-neurological examination.

PERIÓDICO: Journal of Human Growth and Development

SITUAÇÃO: Aceito



JOURNAL OF HUMAN GROWTH AND DEVELOPMENT
 (ISSN 0104-1282 printed and ISSN 2175-3598 on-line)
 Indexed Scopus, Doaj, Index Copernicus - Qualis Capes B1

Sao Paulo, February 06, 2013.

Dear authors,

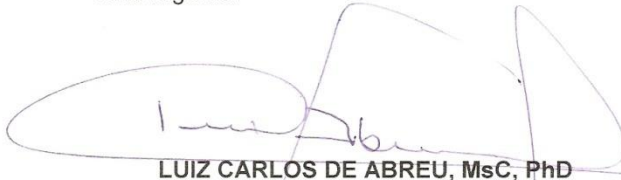
The review of your manuscript "*identify the reasons why these contacts did not seek the USF for the exam dermatology in the municipality of Cajazeiras – PB*", being the authors *Rayrla Cristina de Abreu Temoteo; Marilena Maria de Souza; Maria do Carmo Andrade Duarte de Farias and Eduardo Martins Netto*, is now complete and we, in principle, have accepted it for publication in *Journal of Human Growth and Development*.

We will check the format of your manuscript to ensure that it meets the standards of the journal. After that, you will be contacted and, if needed, informed of any necessary changes.

We remind you that the text will be published in both languages (Portuguese and English), thus, it must be presented in English and immediately forwarded to this email address: rbcdh.fsp@gmail.com

If you have any problems or questions regarding your manuscript, please do get in touch.

Kind regards.


LUIZ CARLOS DE ABREU, MsC, PhD
 Editor, Professor in Public Health
 Editorial Office - RBCDH

54 276 969 / 0001-19

CENTRO DE ESTUDOS DO CRESCIMENTO
 E DO DESENVOLVIMENTO DO SER HUMANO

Av. Dr. Arnaldo, 715 - FSP - USP
 C. César - CEP 01255

SÃO PAULO - SP

Avenida Dr. Arnaldo, 715 – sala 03 do CEP – 2º andar – Cerqueira César. CEP: 01246-904
 São Paulo – SP. Tel/Fax: 3061-7775 . E-mail – cdh@fsp.usp.br e cdh.fsp@usp.br
 Site: www.rbedh.com.br (http://www.revistasusp.sibi.usp.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=0104-1282&lng=pt&nrm=iso)

ORIGINAL ARTICLE

Identifying the reasons why these contacts do not go to the USF for the dermatoneurological examination.

* **Article extracted from the end of course paper LEPROSY:** Identifying of the reasons why household contacts of leprosy patients do not undergo the dermatoneurological examination, from UFCG.

Rayla Cristina de Abreu Temoteo¹; Marilena Maria de Souza²; Maria do Carmo Andrade Duarte de Farias³; Eduardo Martins Netto⁴

ABSTRACT

Background: Household contacts of leprosy patients are means for the endemic maintenance. **Objective:** Aiming at identifying the reasons why these contacts do not go to the USF for the dermatoneurological examination in the municipality of Cajazeiras – PB. **Methodo:** Descriptive exploratory study has a qualitative approach and was performed in three USF in the municipality. The data has been collected through interviews, by applying a structured interview, which has been carried out during home visits to 31 cases of household contacts of patients who were suffering from leprosy; the data has been analyzed through Bardin content analysis. **Results:** It have found out that the main reason for not performing the dermatoneurological examination was the lack of signs and symptoms of leprosy, and feelings such as: fear of the examination, mistrust of the service, among others. **Discussion and Conclusion:** Aiming at convincing the household contacts to perform the prophylaxis and bringing them closer to USF, the professionals should explain to them the way the dermatoneurological examination is carried out and encourage them to face and overcome feelings that may compromise the therapeutic process.

Descriptors: Leprosy. Physical examination. Health centers.

¹ Nurse. She is currently a Master student in Public Health at Universidade Estadual da Paraíba. Specializing in Family Health at Faculdade Santa Maria – FSM – PB. Coordinator of the Tuberculosis and Leprosy Control Programme in the city of Cajazeiras – PB. Member of the Research Group (GEPASH) at UFCG. Cajazeiras, PB, Brazil. Email: rayrlacz@hotmail.com

² Masters in Nursing. She is currently a doctoral student in Medicine and Health at Universidade Federal da Bahia. A teacher at Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Cajazeiras, PB, Brazil. Email: marilenacarolino@uol.com.br

³ PHD in Nursing at Universidade Federal do Ceará (UFC); II Associate Professor at Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Cajazeiras, PB, Brazil. Email: carmofarias@hotmail.com

⁴ Epidemiologist Doctor at Universidade Federal da Bahia and a professor from the Medicine and Health Post UFBA.

INTRODUCTION

Leprosy, also known as Hansen's disease, is an infectious and slowly progressing disease that manifests itself through dermato-neurological signs and symptoms, such as: skin and peripheral nerve lesions, mainly in the eyes, hands and feet, which leads to one of the main characteristics of the disease: the potential to cause physical disabilities which can lead to deformities. Such disabilities and deformities can cause problems, like decreased working ability, social life limitation and psychological problems, and are also responsible for the stigma and discrimination which surround the disease, but which can be avoided or reduced through early detection and treatment with simplified techniques and supervision and monitoring in the primary health care services¹⁻³.

Apart from these problems, it is a curable disease, and the earlier it is diagnosed, the faster it is possible to cure the patient⁴. The population in general, still has little information about leprosy and its transmission, leading the individual to become passive concerning the control of the disease, since a lot of household contacts of leprosy patients do not look for the Health service do undergo the dermato-neurological examination when it is necessary⁵.

In Brazil, although the number of cases has been drastically reduced from 19 to 4,68 leprosy patients per 10.000 inhabitants, between 1985 and 2000, leprosy is still a public health problem whose surveillance needs to be increased. The country has been restructuring the actions aimed at solving this problem since 1985, and in 1999 the government made a commitment of eradicating leprosy until 2005. The aim then, was to reach the rate of less than a leprosy patient per 10.000 inhabitants. However, this strategy has not been achieved yet^{1,2}.

The preventive, promotional and curative measures which have been taken with partial success by the Family Health Teams (*Equipes de Saúde da Família – ESF*), show the strong commitment the health professionals in the team have, highlighting the Community Health Work Agent (*Agente Comunitário de Saúde – ACS*), who has household level experiences concerning the complex issues which surround Leprosy^{1,4}.

Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) or Hansen's bacillus, an intracellular parasite, which has high infectivity and low pathogenic, attacking the skin cells and the peripheral nerves, introducing itself in the organism of an infected person. It has a doubling time of 11 to 16 days on average. Men are considered to be the only source of infection of Leprosy. The disease is transmitted by contact between a person

infected by the Hansen's bacillus, who has not been treated yet, and a person who is susceptible to the disease. The main elimination outlet of the bacillus is the respiratory route. People from all ages can suffer from leprosy, but children are rarely affected, and when it happens, it is possible to observe a greater endemicity of the disease. Both male and female can also suffer from it, but in most parts of the world men are frequently more affected than women^{1,2,4}.

Thus, the complete treatment for leprosy is of paramount importance to eliminate and control the dissemination of the disease. Although leprosy is curable, it needs curative interventions to deal with the reported cases of the disease, such as diagnosis and early treatment, as well as patient compliance to treatment^{1,6}.

In view of the above, the aim of this article is to identify the reasons why the household contacts do not look for the Family Health Units (*Unidades de Saúde da Família –USF*) to undergo the dermato-neurological examination.

METHODS

It's an exploratory descriptive study, with a quality approach carried out from 2010 to 2011; done at the three USF in the municipality of Cajazeiras – PB: São José / PAPS, Sol Nascente and Amélio Estrela Dantas Cartaxo, because they had the highest number of notifications of this disease in the last two years, in comparison to the other USF; Besides that, most of the contacts who weren't examined (registered in the years of 2009 and 2010) also belong to these three units⁷.

The municipality of Cajazeiras is located in the dry backlands of Paraíba state, 477 km from the capital João Pessoa, occupying an area of about 586.275 km². It has a hot humid tropical climate and the estimated population in 2010 was 58.437 inhabitants, with 47.489 (81,27%) in the urban area and 10.948 (18,83%) in the rural area⁸.

The study population consisted of fifty nine (59) household contacts of leprosy patients diagnosed and treated (or undergoing treatment) in the municipality of Cajazeiras – PB, between 2009 and 2010, which have been registered at the USF and that had not undergone the dermato-neurological examination up to the time of the data collection. The sample was composed by thirty one (31) household contacts of leprosy patients who agreed to participate in this study and that met the requirements for inclusion: contacts who had not undergone the dermato-neurological examination

advised by PNCH (considering a contact who has not been examined the one who does not appear in the communicant control card which shows that the examination has been carried out); have taken or not the BCG/ID; household contact of a notified and treated (or undergoing treatment) leprosy patient; teenagers from 15 years of age on and the adults who were able to answer and provide a suitable interpretation of the questions proposed.

The technique used for data collection was a structured interview, which had socio-demographic data, vaccination status and details about the household contact disease. The questionnaire had subjective questions, investigating the reasons why they did not undergo the dermatoneurological examination.

It have considered the ethical guidelines, standards and principles of research involving human beings, which appear in the Resolution n° 196/96, decree n° 93.933/87 of the National Health Council (Conselho Nacional de Saúde (CNS)) in force in the country, mainly concerning TCLE⁹. To ensure their anonymity, the interviewees' statements are identified with – CI (Contato Intradomiciliar – Household Contact), followed by the number of the interview. After approval of the Research Ethics Committee at Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – Project CAAE N° 0387.0.133.000-11 as well as sending the Municipal Department of Health in Cajazeiras an official letter with the opinion provided by the Committee, it started identifying the cases of leprosy notified by the three USF, in the period between 2009 and 2010, by means of data found at SINAN. Next, it carried out a survey focusing on institutional records of leprosy cases, aiming at selecting the household contacts registered at the Contacts' Control Forms. After that, it visited the household contacts in their homes, informing them about the aims of the study, asking them to read and sign the Informed Consent Form – ICF (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE). During the interview, following the script mentioned before, the register was made through recording, after the participants' authorization.

The data collection was carried out directly with household contacts of leprosy patients in their home, in the morning and/ or afternoon, according to the availability of each participant in this study.

The qualitative data was processed by means of content analysis (Análise do Conteúdo – AC), developed by Laurence Bardin, which consists of a set of communication analysis techniques, aiming at obtaining the description of the contents

of messages, indicators that allow knowledge inference concerning the conditions under which these messages have been produced/ received¹⁰.

After the interviews transcript the spoken interview was viewed and then grouped into analysis categories (a method of analysis which is made by theme categories). Through the content of participants' speeches it was possible to discover six theme categories: absence of signs/ symptoms; lack of interest and/or omission; lack of information or inadequate information; schedules incompatibility and/ or work; fear of the examination; and shame of the disease or of the examination.

RESULTS

Interviewees' characteristics

This research revealed that there was no relevant difference because of age, since out of thirty one (31) interviewees, sixteen (16) were men and fifteen (15) were women; sixteen (16) had a partner and fifteen (15) didn't. As regards to education, it was found out that sixteen (16) had not concluded elementary school, eight (8) had not finished high school and four (4) called themselves illiterate.

As regards to age group, twelve (12) of the people interviewed were between fifteen (15) and twenty four (24) years old; seven (7) were from twenty five (25) to forty four (44) years old and the others were above forty four (44). With respect to the activities carried out by the contacts, it have found out the following professions: six (6) housewives and six (6) students, four (4) retired and four (4) self-employed people, three (3) masons and three (3) unemployed, as well as two (2) farmers and one (1) teacher, one (1) truck driver and one (1) trader. As regards to monthly family income, it was found out that seventeen (17) of the contacts lived from one (one) to less than two (2) minimum salaries, six (6) declared they received less than one (1) minimum salary and the others from two (2) to five (5) minimum salaries according to what they said.

Reasons for not undergoing the dermatoneurological examination

Through the participants speeches analysis it was possible to discover six theme categories: absence of signs/ symptoms; lack of interest and/ or omission; lack of

information or inadequate information; schedules incompatibility and/or work; shame and/ or prejudice concerning the disease or the examination; fear of the examination.

The theme category called **“absence of leprosy signs and symptoms”** was observed in the reports of nineteen household contacts who missed the examination and that were participating in this study and the reason given for not undergoing the dermato-neurological examination, according to what they said was:

Because I saw no need in doing that, I’ve never had any patches. (CI – 11)
I didn’t do it because I don’t like undergoing examinations. I’ve never felt anything, so why should I do it? (CI – 19)

On the basis of reports of nine household contacts who did not seek health care, it was found out that the reason for not undergoing the dermato-neurological examination was **“lack of interest and/ or omission”** towards the control activities concerning the contacts, as illustrated in the speech below:

I didn’t do it for lack of interest, I didn’t feel like doing it [...]. (CI – 18)
[...] Why? Because I’m lazy, I don’t have patience for anything. (CI – 21)

According to the reports of eight household contacts who did not seek a health service, it was found out that the reason given for not undergoing the dermato-neurological examination was **“lack of information or inadequate information”** concerning the need to track down the contacts. The following speeches illustrate this situation:

[...] they didn’t tell me. There is shortage of information regarding this illness and that is why people become ill. I have already been affected by leprosy and treated and I thought that it was not necessary to go there again (CI – 26).
[...]the nurse in the health unit said it was not necessary to do the examination, since (someone’s) disease was not very strong and there was no need for carrying out the examination. If you are supposed to contract a disease, there is nothing one can do (CI – 31)

According to the reports of five household contacts who did not seek for health care, it was found out that **“incompatibility of schedules and/or work”**, was the reason given for not undergoing the dermato-neurological examination. This situation is represented in the following speeches:

I didn't carry out the examination because of my job, because I didn't have time. (CI – 14)

I didn't go because they made an appointment for the morning and I couldn't go because I was studying, and in the health unit it is only possible to carry out any examination if you make an appointment, if you arrive there without having done that, they do not check on you. So, I didn't even go there. (CI – 15)

Based on accounts from five household contacts who haven't looked for the health service, it was found out that the reason for not undergoing the dermatoneurological examination was **“fear of the examination”**, which is demonstrated in the following speeches:

I was afraid that people would say that I was suffering from leprosy, without suffering from it. I don't trust the examination carried out in the health unit [...], because they said that my cousin was suffering from that, and it was not true. (CI – 8).

[...] it was fear indeed, I don't like doing medical examinations (CI – 17).

According to four household contacts who did not seek for the health service, it was noticed that **“shame of the disease or of the examination”** was one of the reasons given for not undergoing the dermatoneurological examination. This situation is demonstrated in the following speeches:

I wanted to hide from other people the fact that my family is suffering from this disease (CI – 02)

I decided to take the examination, but I felt ashamed. When they said that I had to undress, then I went home [...]. (CI – 12)

DISCUSSION AND CONCLUSION

The people investigated

As to the age group found, data reveals that the younger people are not undergoing the dermatoneurological examination; a point that deserves closer attention and control by the epidemiological surveillance, because it know that the risk for a young person of working age to become ill is higher because of the leprosy long incubation period ¹¹.

In general, the presented data makes clear that the investigated population presented precarious socio-economic and educational levels. Poverty is a socio-

economic risk factor for leprosy. The leprosy patients are usually young adults coming from the poorest social class and who usually mention the existence of another case in the family. Thus, the searched population can be an easy target for the disease and can even develop the disease, once the sick people mention the existence of other relatives who were also ill, who had probably been a household contact of a leprosy patient^{12,13}.

According to the Ministry of Health, the people who have to be vaccinated with BCG/ID are all the household contacts of leprosy patients who do not have any signs and/ or symptoms of the disease after the dermato-neurological examination¹. However, it has been established that eleven (11) of the household contacts who have not been examined were vaccinated with two doses of BCG/ID, revealing the fact that there are shortcomings for ensuring compliance with the standards laid down by the Leprosy Control Program, as regards contacts vaccination.

It is of paramount importance to control the vaccination of BCG/ID in household contacts of leprosy patients who haven't been examined, because if they are sick, clinic sign of leprosy can appear soon after the vaccination, which is related to immune response increase. This happens with people who have contracted the disease¹.

When investigating the cases of leprosy sickness among the people who participated in this study it was found out that two (2) household contacts had contracted the disease some years before. Although it was a small number, it shows how important and necessary the contacts surveillance in the municipality of Cajazeiras – PB is, in order to prevent recurrence or a new case by reinfection.

Reasons for not undergoing the dermato-neurological examination

General Aspects

A study carried out by Ferreira¹⁴, in household contacts of patients of leprosy in the municipality of Paracatu-MG -between 2004 and 2006, found out that the main reasons for not undergoing the dermato-neurological examination were: work, lack of information and omission.

The analysis of the household contacts' perform evaluation is one of the ways to evaluate the performance of the services in the area concerning the control actions¹ they have applied. Brazil has been showing a regular parameter which is close to precarious, with only about half of the household contacts having been examined (50,5%) between

2001 and 2007¹⁵. Concerning the same period, the Northeast region in Brazil has one of the worst rates in the country, because only 49,5% of these household contacts were examined, which is considered a very precarious parameter according to the National Leprosy Control Programme (PNCH – Programa Nacional de Controle da Hanseníase)¹⁶.

Following confirmation of a leprosy case, one of the activities carried out is the epidemiological investigation, which is made through the surveillance of household contacts of leprosy patients, due to the fact that the relatives are the people who are most exposed to the disease and therefore run the biggest risks of contracting the disease¹. The Health Ministry considers that there is on average 1 out of 4 contacts who live in the same home¹. The same institution defines household contacts as any natural or legal person who lives or has lived with the patient in the last five years⁴.

Although leprosy tends to stabilize, according to analysis of long historical series concerning new cases discovery in people who are under 15, in all states of Brazil, mainly in the North and Central west and Northeast, there is a high number of people suffering from leprosy. It is also in these places that the 5 more meaningful clusters, responsible for more than 50% recently new cases, are found¹⁷.

The General Office of Sanitary Surveillance of the Ministry of Health (Secretaria de Vigilância em Saúde (SVC)) has disclosed the detection coefficient and prevalence rate of leprosy in Brazil concerning the years of 2008 and 2009, which are: 20,59/100.000 inhabitants, 2,06/10.000 inhabitants in the first year and 19,64/100.000 inhabitants, 1,99/10.000 inhabitants in the following year¹⁶.

In Paraíba, although the number of patients suffering from leprosy has decreased, in 2009 it was above 2 out of 10.000 inhabitants and it is important to highlight that the municipalities in this state are among the 10 areas of greatest risks of case detection, according to cluster studies. The rate of contacts who were examined is 37,7% on average, between 44,4% in 2002 and 32,7% in 2007. The situation in this state has been considered precarious since 2001¹⁷.

The three cities in Paraíba with the highest number of leprosy cases are Cajazeiras, Campina Grande and João Pessoa¹⁸, showing the urgency of taking necessary actions, like the implementation of control actions in these municipalities.

In Cajazeiras – PB -, the detection coefficient of new cases diagnosed as leprosy in 2009 was 23.69/10.000 inhabitants¹⁹. Between the years of 2009 and 2010, 58 and 75 new cases of leprosy have been diagnosed; 569 household contacts were registered,

but only 363 were examined, in both years (adding up to a number of 166 people who were not examined)⁷.

In practice, in face of the PNCH, in the municipality of Cajazeras – PB it have found out that some household contacts haven't been to the Family Health Units (Unidades de Saúde da Família (USF)) to undergo the dermato-neurologic examination, or when they have looked for the service, only the vaccine Bacilo de Calmette-Guérin/ Intradérmica (BCG/ID) was applied or some orientations were given.

Theme Categories

I: Lack of Leprosy signs and symptoms

The clinical characteristics of leprosy vary, it usually affects the skin with progressive loss of peripheral sensation, and/or involvement of peripheral nerves, with or without thickening, associated with sensitive and/ or motor and/or autonomic skills alterations²⁰. In contrast, there is the possibility of having asymptomatic bearers of the disease who are usually the source of infection to household contacts. This possibility is pointed out as an important epidemiological aspect concerning the control of the notifying leprosy patients¹². For this reason, there is an urgent need for tracking down the contacts more carefully, taking longer to evaluate each case and doing it more precisely, so that it is possible to realize alterations, signs and symptoms still in an initial phase.

In this regard, the Project called: Health-care diagnostic in the metropolitan region of Recife and Porto Alegre, presented to the Ministry of Health in 2005, highlighted the following reasons given by the population for not seeking health services in the last 12 years: the absence of a health problem; lack of time; difficulty in accessing health care services; delayed service, among others²¹.

In a related investigation about the reasons why the population does not seek health services in Brazil, it was found out that one of the possible and principal reasons for that was: the people did not realize the need for doing that. Based on this information, it may conclude that people in general do not take measures to prevent diseases and they only seek for health services when they are really ill, when they notice some kind of change concerning their health. Sometimes, a lot of people need, but do

not seek for the health service for many reasons, such as the fact that they find themselves unable to determine their health conditions and their disease. Therefore, it is a real challenge for SUS to reach this segment of the population ²².

II: Lack of interest and/ or omission

Although lack of interest has been reported by the participants, it is believed that the disinterest on taking care of themselves depends on the lack of essential information they have and that learning the correct ways to live is related to the transfer of specialized knowledge for a lay population who need to unlearn much of the information acquired in their daily lives ²³.

Results of another study also show the omission and lack of interest of household contacts of leprosy patients in seeking health care as reasons for not undergoing the dermato-neurological examination¹⁴.

The lack of interest in taking care of themselves was also found out in the Amazonian women's speech concerning the Papanicolaou test, considering the fact that even living close to a Health Unit, they only looked for the service when they were already ill and not aiming at taking preventive measures ²⁴.

III: Lack of information or inadequate information

Lack of information is pointed out not only as the principal reason for the incidence rate of leprosy in the country, but also for the prejudice and discrimination that still surround the disease²⁵.

One of the difficulties found out for the leprosy contacts to undertake prophylaxis has been the lack of knowledge concerning leprosy ²⁶. For this reason, it is important to keep the contact, mainly the household contact, informed about the disease, so that the difficulties in making him undertake the disease control efforts can be overcome.

Not only concerning the prevention and treatment of leprosy specifically, the fact that contacts do not undertake prophylaxis can be related to the lack of information about the seriousness of the pathology and the importance to take preventive measures such as the dermato-neurological examination, as well as the information about the fact that this examination is really easy to be carried out; and the distance of the patients

from the health service ²⁷. Lack of information also creates fear and insecurity, making it difficult to create a sense of health ownership, as well as quality life improvement ²⁸.

Thus, information about the importance and the way each examination is carried out are of paramount importance for the patients to undertake the prophylaxis against leprosy.

IV: Incompatibility of schedules and/or work

From what it have already seen, it notice that one of the reasons given for not seeking help in health units is the lack of time associated with work; and that many people put their job in first place, forgetting the fact that if they do not take care of their health, it will become difficult to work and to perform their activities satisfactorily.

It can also be observed that most primary care services have reduced work hours, which are not enough to meet the demands of the local community. Although there is better delivery of health services in the urban area, they are not enough because the long delay for medical care and incompatible schedule are great reasons given by the contacts for not seeking the service ²⁹.

In this study, the reason mentioned before was pointed out by four (4) men and one(1) woman. These findings support the reason given for the men in order not to seek the health service, due to the working hours of the health units which match with their jobs, as well as the fact that when they look for the health services they have to wait in line, which requires a long time to be spent and it, sometimes, can make them miss the working day, having to come back to the health unit more than once, without having their problems entirely solved ³⁰.

With regard to the obstacles to undergo the dermato-neurological examination, the household contacts have pointed out work as the main factor, followed by lack of information and omission ¹⁴. In contrast, the working hours at the USF has been pointed out as the major problem once it matches the contacts' and/ or the patients' ²⁶.

V: Fear of the examination

On the basis of three interviewees' speeches it was found out that fear produced lack of confidence in the health service, as it is demonstrated in C1 – 8 speech. In this regard, the confidence the patients and their families have in the health family

professional team is of paramount importance, taking into consideration the fact that the person using the health service is the central pillar of the Family Health Strategy (*ESF – Estratégia de Saúde da Família*).

The nursing school aims at enabling the professional to provide the human being-patient-customer with health care services, to use and develop technologies and procedures that implement health, to prevent diseases and to help patients to recover from injuries. In view of all that, the mutual trust amongst the people involved (client and professional) is essential to consolidate this process³¹.

If the person using the health service does not trust the professional team, the process is slowed down, because the users have to provide important information about their habits and health needs, which are often confidential and embarrassing. Besides that, when they accept to be treated by the ESF staff, they put their health on the hands of these professionals, and for this reason, the success of the treatment depends to a great extent on the trust and confidence they have in them, since the diagnoses and prescriptions they suggest should be observed. However, the confidence in the Community Health Agent (*ACS – Agente Comunitário de Saúde*) has a central role in the entire process, since he is the link between public authorities and the community, having the role of being an important facilitator and of optimizing the actions taken towards SUS users³².

Fear is a common obstacle for people to look for the health services to undergo the examination. It can be fear of the diagnosis, of future deformity, of being exposed as having leprosy, or that one's family will suffer on account of the patient. Such fears can persist long after the attitude and general perceptions of the disease have become more tolerant, and that the situations involving public discriminations have become rare².

This feeling is common in leprosy patients and their families, because it is surrounded by prejudice and taboos which have existed since our early days. Despite the fact that there is a cure for this disease, it is not rare to find people with such explicit fear nowadays³³.

In the present study, the interviewees' fear may be related to the steps of the examination, which also refers to lack of information, because if they knew the way the examination is carried out, they may not be so afraid of that; or it may also refer to the fact that they can undergo the examination and discover that they are really suffering from leprosy.

The speeches of CI – 8 and CI – 17 suggest that it is not enough to perform preventive actions in the health units, what is necessary to do is to provide the household contact of leprosy patients with integral assistance, taking into consideration the fact that this person may not know how the examination is performed and that he/she has the right to be informed as the way it is carried out, without having his/ her beliefs towards the disease pre-judged. It is believed that if these people received health education and information, they may take part in the activities concerning diseases control.

VI: Shame of the disease or of the examination

This research has found out that two (2) contacts men's who were ashamed of the physical examination and two (2) women were ashamed of the disease. On the other hand, the shame of the disease reported by the women shows the social stigma surrounding leprosy. The answers given by the men show that the reasons why the men seek health services less than the women is the shame to be physically exposed and this possibly happens because they haven't developed the habit of undergoing health examinations³⁰.

Nowadays, leprosy still remains a heavy Public Health burden in Brazil. Besides the aggravating factors concerning any disease with socio-economic origins, it is important to highlight the psychological repercussions caused by the physical disabilities which can be a consequence when the disease is not properly treated. Such disabilities are indeed the great responsible for the patient's social stigma and isolation³.

All the aspects concerning disease control are affected by the stigma against the leprosy patients. It is necessary to raise public awareness when taking steps towards the disease, neither exaggerating nor minimizing the possible consequences the disease can bring to the patient^{34, 35}.

The social stigma concerning leprosy helps to worsen the problem in Brazil. This fact supports the reason given by some household contact for not undergoing the dermato-neurological examination, since they live with factors which can lead to physical disabilities^{11, 36}.

Fear and stigma are difficult to eradicate. They can only be addressed successfully through a combination of strategies that include the dissemination of factual information about leprosy and its treatment, context-specific media messages addressing

misconceptions and traditional beliefs about leprosy; building a positive image about leprosy and through the testimonies of people who have been cured from leprosy. Other actions which would help to build a positive image towards leprosy patients would be: to establish a link between the community and the patient treated; the success of self-care; rehabilitation, aiming at increasing patients' power and to provide professional advice in order to increase their self-esteem².

Psychosocial problems are related to widely-held beliefs and deep-rooted prejudices concerning leprosy and its underlying causes and not merely to the problem of disability. Leprosy patients usually suffer from low self-esteem and depression, which stem from rejection and hostility caused by their families and the society. These negative attitudes are also observed in the attitudes of health care professionals, including doctors².

Therefore, the professional, mainly the nurse, should show and convince the contact that the dermato-neurologic examination is a simple procedure, but which must be performed by a professional; it is carried out so that the patient and all the people who live with him/ her can benefit from that, making the person feel comfortable, informing them that the patches can be anywhere on their bodies, and that they may not be visible. For this reason, the ideal is that the patient's assessment is made by a professional who is able to recognize these patches.

Regarding the reasons given for the household contact for not seeking health services to undergo the dermato-neurological examination, it was found out that most of the people participating in this study considered that there was no need to look for the service, because of absence of signs/ symptoms of the disease. Besides that, other reasons given were the USF working hours, which were not compatible with their available schedules; lack of information or inadequate information; lack of interest and/ or omission; fear of the examination; shame or prejudice concerning the disease and shame of undergoing the dermato-neurological examination.

As the main reason given by the household contacts for not seeking health services was the absence of signs/ symptoms, it believe that the healthcare professional staff should take measures to convince these contacts to be examined, even when they claim that they do not have leprosy signs/ symptoms, assessing if they are ill or healthy and informing them about the need to seek health service periodically, despite the fact that the Ministry of Healthy calls for returning to the health service only when it is necessary, in other words, when there are patches on the skin, considering that because

of the long incubation period, the disease can manifest up to seven years after the exposure to it. For this reason, it is necessary for the contacts to be re-evaluated.

In order to maximize patient compliance towards prophylaxis, as well as to promote a link with the health professional, particularly the nurse during the performance of the dermato-neurological examination, the professional should make the contact feel comfortable and explain the way the examination is carried out, informing him/her that the patches can appear anywhere on the body and encourage him/her to avoid and face the feelings of fear, shame and prejudice, which can disturb the entire therapeutic process.

Despite the difficulties found for carrying out this study, since there are not many researches about the issue addressed, as well as the fact that a lot of researchers have pointed out in recent years that the surveillance of household contacts of leprosy patients is almost ignored, it hope that the dissemination of the results of this study enables health professionals to find solutions to change the real situation of household contacts of leprosy patients by improving the current epidemiological scenario of leprosy in the municipality of Cajazeiras – PB.

Taking the results found in this study into consideration, it suggest:

- to intensify the search for household contacts, to improve both data record and BCG/ID vaccination control;
- to promote and implement educational actions, as well as actions to reduce the effects which are still caused by prejudice towards patients and their families in Cajazeiras – PB, using the media, health and educational professional to inform the patient, the family and the community in general about the disease;
- To implement an identification and tracking form for the household contact of leprosy patients suffering from paucibacillary (PB) leprosy to be able to track them down for two years, and another one for the patients suffering from multibacillary (MN) leprosy to be able to track them down for five years, as well as a card for arranged appointments with the household contact of leprosy patients.

REFERENCES

1. Dessunti EM, Soubhia Z, Alves E, Aranda CM, Barro MPAA. Hanseníase: o controle dos contatos no município de Londrina-PR em um período de dez anos. Rev. bras. Enferm. [serial on the Internet]. 2008 nov [acesso em 2013 jan 11]; 61(spe): 689-693. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000700006&lng=en DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71672008000700006>
2. Ferreira, ILCSN. Subsídios para reorientação dos serviços de saúde em relação aos contatos de portadores de hanseníase de Paracatu (MG) [dissertação] [Internet]. Franca: Universidade de Franca; 2010. [acesso em 2013 jan 11]. Disponível em: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp138707.pdf>
3. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o controle da hanseníase. 3.ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2002. 89 p. [acesso em 2013 jan 11]. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniase.pdf
4. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Hanseníase – Informe Epidemiológico - 2008. Vigilância em saúde: situação epidemiológica da hanseníase no Brasil 2008. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. 12 p. [acesso em 2013 jan 11]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_novembro.pdf
5. SINAN – NET / Cajazeiras. Versão NET 4.0/Patch 4.2.: Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica. Secretaria de Saúde de Cajazeiras, 2010. Base de dados. [acesso em 2012 dez 15]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tab_18_contatos_registrados_examinados_2010.pdf
6. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. 195 p. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/abca21.pdf>
7. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Hanseníase. Hanseníase no Brasil: dados e indicadores selecionados. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. 66 p. Disponível em: http://www.morhan.org.br/views/upload/caderno_de_indicadores_hanse_brasil_01_a08_atual.pdf
8. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Planejamento e Orçamento. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde - Relatório de Situação - Paraíba. 5.ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. 35 p. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_pb_5ed.pdf
9. Secretaria Municipal de Saúde (Cajazeiras). Plano Municipal de Saúde - 2008/2009.

10. Ministério da Saúde (Brasil). Sistema de Informação de Agravos de Notificação – NET. Vigilância Epidemiológica. Cajazeiras: Secretaria de Saúde de Cajazeiras; 2011.
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (Brasil). [online]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1> Acesso em 30 de março de 2011.
12. Conselho Nacional de Saúde (Brasil). Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. [acesso em 2013 jan 13] Disponível em: http://dtr2004.saude.gov.br/susdeaz/legislacao/arquivo/Resolucao_196_de_10_10_1996.pdf
13. BARDIN, L. Análise de conteúdo. Lisboa: Edições 70; 1977.
14. Vieira CSCA, Soares MT, Ribeiro CTSX. Avaliação e controle de contatos faltosos de doentes com Hanseníase. Rev. bras. Enferm. [serial on the Internet]. 2008 nov [acesso em 2013 jan 11]; 61(spe): 682-688. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000700005&lng=en DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71672008000700005>
15. Pinto Neto JM, Villa TCS, Mercaroni DA, Gonzales, RC, Gazeta, CE. Considerações epidemiológicas referentes ao controle dos comunicantes de hanseníase. Hansenol Int. [serial on the Internet]. 2002 jan-jun [acesso em 2013 jan 11]; 27(1): 23-28. Disponível em: www.ilsl.br/revista/detalhe_artigo.php?id=10618
16. Lombardi C, Ferreira J. História natural da hanseníase. In: Lombardi C, coord; Ferreira J, Motta CP, Oliveira MLW. Hanseníase: epidemiologia e controle. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado; 1990. cap. 1, p. 13-20.
17. Ministério da Saúde (Brasil). Gabinete do Ministro. Portaria nº 3.125 de 07 de outubro de 2010. Diário Oficial da União. Diretrizes para Vigilância, Atenção e Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da saúde; 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_n_3125_hanseníase_2010.pdf
18. Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Sócio-Econômicos – DIEESE (Brasil). Projeto: Diagnóstico dos serviços de saúde em duas regiões metropolitanas: aplicação de questionário suplementar na pesquisa de emprego e desemprego – PED. Projeto para apresentação ao Ministério da Saúde. Produto IV. 2005.
19. Osório RG, Servo LMS, Piola SF. Necessidade de saúde insatisfeita no Brasil: uma investigação sobre a não procura de atendimento. Ciênc. saúde coletiva [serial on the Internet]. 2011 set [acesso em 2013 jan 11]; 16(9): 3741-3754. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011001000011&lng=en DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232011001000011>
20. Meyer DEE, Mello DF, Valadão MM, Ayres, JRCM. "Você aprende. A gente ensina?": interrogando relações entre educação e saúde desde a perspectiva da vulnerabilidade. Cad. Saúde Pública [serial on the Internet]. 2006 [acesso em 2013 jan 11]; 22 (6): 1335-1342 [acesso em 2013 jan 11]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-

311X2006000600022&lang=pt DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006000600022>

21. Silva SED, Vasconcelos EV, Santana ME, Lima VLA, Carvalho FL, Mar DF. Representações sociais de mulheres amazônidas sobre o exame papanicolau: implicações para a saúde da mulher. Esc. Anna Nery [serial on the Internet]. 2008 dez [acesso em 2013 jan 11]; 12 (4): 685-692. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-81452008000400012&lng=en&nrm=iso DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1414-81452008000400012>

22. Medeiros, D. Desinformação afeta combate à hanseníase: garoto propaganda da campanha, o cantor Ney Matogrosso esteve ontem em Campinas. Correio Popular: Campinas; 01 maio, 2003. [acesso em: 2013 jan 14]. Disponível em: www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?down=CMUHE042625

23. Augusto CS, Souza MLA. Adesão do comunicante de hanseníase à profilaxia. Saúde Coletiva. [serial on the Internet]. 2006 [acesso em 2013 jan 11]; 1 (3): 1185-1190. Disponível em: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=84212137005>

24. Souza AB, Borba PC. Exame citológico e os fatores determinantes na adesão de mulheres na estratégia de saúde da família no município de Assaré. Cad. Cult. Ciênc. [serial on the Internet]. 2008 [acesso em 2013 jan 11]; 2 (1): 36-45. Disponível em: <http://periodicos.urca.br/ojs/index.php/cadernos/article/view/17/17-57-1-PB>

25. Cavalcante MMB. A atuação do Enfermeiro da Equipe de Saúde da Família na Prevenção e Detecção Precoce do câncer cérvico-úterino. Sobral, 2004. 49f. Monografia (Curso de especialização em Saúde da Família) – Universidade Estadual Vale do Acaraú. Disponível em: <http://www.nescon.medicina.ufmg.br/biblioteca/imagem/3054.pdf>

26. Pinheiro SP, Viacava F, Travassos C, Brito AS. Gênero, morbidade, acesso e utilização de serviços de saúde no Brasil. Ciênc. saúde coletiva [serial on the Internet]. 2002 [acesso em 2013 Jan 13]; 7(4): 687-707. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232002000400007&lng=en DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232002000400007>

27. Gomes R, Nascimento EF, Araújo FC. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior. Cad. Saúde Pública [serial on the Internet]. 2007 [acesso em 2013 Jan 13]; 23 (3): 565-574. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-311X2007000300015&script=sci_arttext DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2007000300015>

28. Baggio MA. O significado de cuidado para profissionais da equipe de enfermagem. Rev. Eletr. Enferm., 2006 [acesso em 2013 Jan 13]; 8 (1): 09-16. Disponível em: <http://www.revistas.ufg.br/index.php/fen/article/view/949/1164>

29. Valentim IVL, Krueh AJ. A importância da confiança interpessoal para a consolidação do Programa de Saúde da Família. Ciência & Saúde Coletiva. 2007 [acesso em 2013 Jan 13]; 12 (3): 777-788. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232007000300028

30. Organização Mundial de Saúde - OMS. Estratégia global aprimorada para redução adicional da carga da hanseníase: 2011-2015: diretrizes operacionais (atualizadas). 2010. [acesso em 2013 Jan 13]. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde.
31. Ferreira MLSM. Motivos que influenciam a não-realização do exame de Papanicolaou segundo a percepção de mulheres. *Revista de Enfermagem*. 2009 abr-jun [acesso em 2013 Jan 13]; 13 (2): 378-8. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ean/v13n2/v13n2a20.pdf> Distrito de Rubião Júnior. Escola Anna Nery.
32. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de prevenção de incapacidades. 3 ed. Brasília, 2008. [acesso em 2013 jan 13] Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/incapacidades.pdf>
33. Baison KA, Van den Borne B. Dimensions and process of stigmatization in leprosy. *Lepr. Rev.* 1998 [acesso em 2013 jan 13]; 69(4): 341-50. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9927806>
34. Romero-Salazar A, Parra MC, Moya-Hernández C, Rujano R, Salas J. El estigma en la representación social de la lepra. *Cad. Saúde Pública* [serial on the Internet]. 1995 dez [acesso em 2013 fev 06]; 11(4): 535-542. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1995000400002&lng=en DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1995000400002>
35. Evangelista CMN. Fatores sócio-econômicos e ambientais relacionados à hanseníase no Ceará [dissertação]. Fortaleza: Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará; 2004. Disponível em: http://www.repositorio.ufc.br:8080/ri/bitstream/123456789/999/1/2004_discmnevangelista.pdf

4.3 ARTIGO 3

TÍTULO: SCREENING FOR LEPROSY AND *MYCOBACTERIUM LEPRAE* INFECTION USING LID-1 AND PADL RECOMBINANT ANTIGENS

PERIÓDICO: The Lancet Infectious Diseases

SITUAÇÃO: Submetido

SCREENING FOR LEPROSY AND *MYCOBACTERIUM LEPRAE* INFECTION USING LID-1 AND PADL RECOMBINANT ANTIGENS

Marilena Maria de Souza I, Eduardo M Netto II, Maria Nakatani II, Malcolm S Duthie III

I - Federal University of Campina Grande, Cajazeiras, Paraíba, Brazil,

II -Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

III - Infectious Disease Research Institute, Seattle, WA, USA

Summary

Background Leprosy is still an important public health disease in the world. Despite the widespread use of multidrug therapy, the number of new cases remains constant in many countries. One of the most serious problems to the disease elimination is the absence of high sensitivity and specificity tests. This study used a population-based design in a Brazilian hyperendemic area to determine the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values for leprosy of LID-1 (Leprosy IDRI Diagnostic-1), and PADL (Protein Advances for the Diagnosis of Leprosy) recombinant antigens.

Methods The study was conducted in the municipality of Cajazeiras/Paraiba. We performed serological evaluation of 2526 randomly selected individuals from 10472 residents of two neighborhoods that have persistently demonstrated a high incidence of leprosy. Almost all seropositive (95%) and a subset of seronegative (17.1%) subjects then underwent physical examination and complete diagnostic investigation.

Findings Active case finding revealed that the prevalence of leprosy was 2.3% (19 cases among 834 fully examined individuals) in the municipality of Cajazeiras/Paraiba/Brazil. The fusion proteins LID-1 and PADL had a high sensitivity in the field survey, respectively 89% and 87%, being negative only in two paucibacillary subjects. The specificity was low, 42% and 38%, respectively. The positive predictive value (PPV) for LID-1 and PADL was 3.5% and 3.7% respectively, with both tests having a negative predictive value (NPV) of 99%.

Interpretation Our data indicate that the LID-1 and PADL antigens are highly efficient at excluding leprosy in seronegative individuals. As a single data point, however, they had low value for predicting disease. The follow-up of those seropositive subjects could clarify the predictive value of LID-1 and PADL.

Keywords: Leprosy. Diagnosis. Serology. *Mycobacterium leprae*.

Introduction

Leprosy is an infectious granulomatous disease caused by *Mycobacterium leprae*, which affects the skin and peripheral nerves, leading to disability. Despite the widespread use of multidrug therapy (MDT), the number of new cases diagnosed each year remains stable in many countries. The World Health Organization has established diagnostic criteria for considering a person who has one or more of the following key signs: appearance of hypopigmented or reddish lesion with hypoesthesia, presence of acid fast bacilli (AFB) lymph node smears and compatible skin lesion histopathology¹. Adopting only one key criterion for the diagnosis presents limitations because not all lesions are obviously hypopigmented or erythematous, and they are not always anesthetic in the multibacillary (MB) forms². Although histopathology of a skin lesion may support the clinical diagnosis, especially when a neural infiltration and/or bacilli are found³, the problem is that neither has good sensitivity, especially in those with indeterminate or tuberculoid presentations⁴.

Several serological tests have been developed to detect IgG, IgM and IgA antibodies using the native PGL-I or its semisynthetic bioproducts⁵. While these tests are applicable to MB patients in which seropositivity rates range between 80% and 100%, they have diminished importance for PB patients in which seropositivity ranges from 30% to 60%⁶. Following the publication of the *Mycobacterium leprae* genome, several proteins that are recognized by antibodies from leprosy patients have been identified^{7,8}. These have been used to screen healthy individuals who are at risk of developing the disease or are experiencing early signs of leprosy, and also to monitor the effectiveness of multidrug therapy (MDT)⁹. We previously demonstrated the ability of fusion proteins LID-1 (Leprosy IDRI Diagnostic-1; comprising ML0405 and ML2331) and PADL (Protein Advances diagnostic of leprosy, including reactive portions of ML0405, ML2331, ML2055, ML0091 and ML0411) in diagnosing MB patients¹⁰. Further research is needed to determine whether these antigens can detect early infection and the progression to disease¹¹. In this context, using a population-based design, this study aimed to determine the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of LID-1 and PADL for the diagnosis of leprosy in a hyperendemic city in Brazil.

Materials and Methods

Study location

The study was conducted in the municipality of Cajazeiras/Paraíba/Brazil, which has a total population of 58,437 inhabitants¹² and is situated 450 km from the state capital. According to World Health Organization standards¹³, the city is considered a leprosy hyperendemic area, having a detection rate of 107/100,000 inhabitants in 2010¹⁴. The neighborhoods of Sol-Nascente (4861 inhabitants) and Capoeiras (5611 inhabitants) were chosen on the basis of their having had a notification rate between 17-19 cases per 10,000 inhabitants in previous years.

Study design

Sample size was calculated based on various assumptions. Recent active case finding studies have indicated that the prevalence of leprosy may be at least four to six times the reported incidence rate within any particular region^{15,16}. Applying this possibility to our

cohort, we predicted that 90 new cases might be discovered (range 72-108). Moreover, using an estimated 85% sensitivity for MB leprosy of LID-1 and PADL¹¹, and permitting an absolute accuracy of 15% around this sensitivity, 22 individuals were predicted to be truly positive for leprosy. To find 22 positive individuals with the prevalence of 90/10,400 individuals, i.e., the hypothesis that the incidence would not vary substantially between 2008 and 2012, with a significance level of 5%, 3,000 individuals would take part in the study in the study areas. As the prevalence of infection (seropositivity) found was higher than estimated, blood collection was stopped after 2,526 individuals.

Permanent residents of both genders were included. Individuals who had previously been treated for leprosy were excluded. A Brazilian program called “Family Health Strategy” holds records of all inhabitants and this list was used to randomly select 1500 individuals from each neighborhood using an EXCEL software algorithm. These individuals were invited to attend the local health center; those who could not come were visited in their homes. After signing informed consent forms, each recruit completed a questionnaire and blood was collected. Twenty-eight individuals (10 from Sol-Nascente and 18 from Capoeiras) were excluded because they refused to provide a blood sample.

After generating serology results, 834 individuals were invited to undergo dermatologic examination (all seropositive individuals and a randomly selected subset of seronegative individuals). If they did not attend the health center, they were visited and asked to continue their participation in the study.

Serology

Blood samples were collected from March to October of 2011. After collection, the blood was allowed to clot for 15-45 minutes, then centrifuged and the serum collected into two vials before storing at -20°C. Serological tests were performed at the Infectious Diseases Research Laboratory at Federal University of Bahia (LAPI / UFBA), using the LID-1 and PADL antigens as previously reported¹⁰. Each sample was assessed in duplicate and the results expressed as the average of the two data points. To ensure robust data were generated, more than 30% of the samples were re-evaluated and similar results obtained. Results were considered positive when the mean absorbance was greater than the cutoff, which was calculated as the average of four negative control sera plus three standard deviations.

Dermatological examination

The dermatological examinations were performed between December 2011 and March 2012. All skin areas were inspected by trained individuals, in the presence of natural light, for characteristic signs of leprosy. If the patient presented any area with hypo/hyperpigmentation, then thermal, tactile and pain sensitivity tests were performed, as described by others^{3,17,18}. Individuals with suspicious lesions had specimens collected from four areas (right and left earlobes, right elbow and the lesion itself) and these were examined for the presence of AFB, as revealed by Ziehl-Neelsen stain¹⁹. When the lesion remained suspicious (with loss of thermal, painful and tactile sensitivity, and color change), individuals negative for AFB were referred for examination by a leprosy specialist who further reviewed the case. In case of doubts, the suspected skin lesions were biopsied and fixed in 10% buffered formalin, with microscopy performed by an

accredited histopathology laboratory (Institute Clinical Pathology Hermes Pardini - MG / Belo Horizonte). After receiving the results of the biopsy, a dermatologist reviewed the compiled data (patient history, AFB results and dermatological examination) to establish the diagnosis. Leprosy diagnosis was based on the identification of these signs and symptoms, with patients classified operationally for treatment as either multibacillary (MB) or paucibacillary (PB)¹⁷. Neurological damage was identified by evaluation of the eyes, nose, hands and feet, palpation of peripheral nerve trunks, muscle strength assessment and evaluation of sensation in eyes, upper and lower limbs¹⁸.

Statistical analysis

Data were added in a spreadsheet (Excel software) and then exported to a database (SPSS18.0). The socio-demographic data were analyzed using descriptive statistics and for prevalence of leprosy with appropriate confidence intervals (Fleiss exact test²⁰). The prevalence of the sample with serology and clinical examinations (dermatological) and laboratory was adjusted for the population of the districts. Assay sensitivity, specificity, positive and negative predictive value were calculated for both LID-1 and PADL²¹. The chi-square test was used to calculate the association between seropositivity and comorbidities. The level of significance used was 0.01 to adjust for multiple comparisons. Sampling fraction – positive (100%), negative (70% of the positives); Estimated N cases for each positive fraction - uncorrected prevalence X prevalence in the population X population.

Ethical aspects

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Campina Grande (Protocol No. 20101310-037). All individuals with leprosy were referred for MDT. Individuals with lesions of other diseases were referred for appropriate treatment.

Results

Utility of LID-1 in screening to detect leprosy cases.

Among the intake population of 2626, 516 individuals (19.6%) tested positive for the presence of antibodies against LID-1. Using the assumption that the presence of anti-LID-1 antibodies is an indicator of *M. leprae* infection and a risk factor for leprosy, all of the individuals seropositive for LID-1 and 22% and 13% of the seronegative individuals from Capoeiras and Sol Nascente, respectively, were invited for further examination. Forty individuals were lost to follow up (35 not located, 5 had died). The prevalence of leprosy was 19 confirmed cases (6 MB and 13 PB) among the 834 examined subjects (unadjusted prevalence: 2.3%; 95% CI: 1.4–3.5%). While the age and gender composition of the general population was reflected in the examined population (Table 1), we were surprised, given its extended propagation time, to find that those individuals diagnosed with leprosy were on average 4 years younger than the general population. Leprosy was also more common in females, who represented 73.7% of the cases detected versus 26.3% of the cases in males.

Seventeen of these confirmed patients were positive, and two were negative, for serum antibodies against the LID-1 antigen. While all 6 MB patients were seropositive, both seronegative individuals were among the 13 PB patients. Thus, among confirmed

patients, the sensitivity for LID-1 was 89.5% (95% CI: 69.4–98.2%). For the study population as a whole, the PPV of seropositivity for LID-1 was 3.5% (17 patients among 490 seropositive) and NPP was 99.4% (2 patients among 490 seronegative). The combination of a suspect skin lesion with seropositivity increased the PPV from 3.5% to 23.0%.

As the proportions of LID-1 seropositive and negative individuals in the population were different, extrapolation to encompass all residents in both of the sampled neighborhoods estimates a corrected disease prevalence rate of 1.1% (95% CI: 0.9–1.3%) (Table 2) and predicts a total of 110 leprosy cases. Thus, active surveillance indicates that approximately 90 additional cases may be found beyond the historical case numbers reported.

Age							
		N	Mean	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
Neighborhood				Lower Bound	Upper Bound		
Sol	Total population	1311	38.4	37.4	39.4	10	91
	Nascente						
	Sample examined	544	36.9	35.5	38.4	10	87
Capoeiras	Population	1215	38.4	37.3	39.5	10	100
	Sample Examined	290	36.4	34.2	38.5	10	83
Leprosy Patients		19	31.1	22.3	39.9	11	81

Male Gender							
		N	%	95% Confidence Interval for Mean			
Neighborhood				Lower Bound	Upper Bound		
Sol	Total population	1311	40.4	37.8	43.1		
	Nascente						
	Sample examined	544	36.7	32.8	40.7		
Capoeiras	Population	1215	41.4	38.6	44.1		
	Sample Examined	290	40.8	35.4	46.4		
Leprosy Patients		5	26.3	10.3	49.1		

Table 1: Age and Gender in the population and sample examined for the Hansen's disease Survey in Cajazeiras/Paraíba, Brazil - 2013.

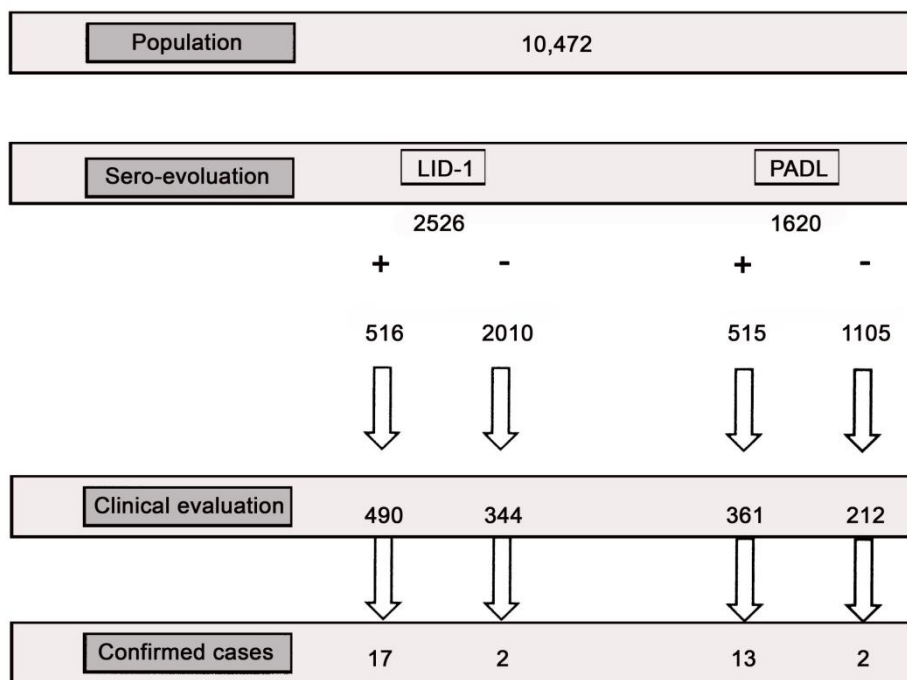


Figure 1 - Evaluation sequence and case finding using LID-1 and PADL as biomarkers in Cajazeiras, Paraiba, 2011

Area	LID Índex	Population Sampled		Individuals Examined	Hansen cases		Estimated number of cases in the neighborhoods
		N	%		N	%	
Sol Nascente	Positive	352	26.8	335	7	2.1	27
	Negative	959	73.2	209	2	0.96	34
	Total	1311		544	9	1.7	61
Capoeiras	Positive	164	13.5	155	10	6.5	49
	Negative	1051	86.5	135	0	-	0
	Total	1215		290	10	3.4	49
Overall	Positive	516	20.4	490	17	3.5	76
	Negative	2010	79.6	344	2	0.6	34
	Total	2526		834	19	2.3	110

Table 2 - Prevalence of Hansen's disease using LID-1 antigen as seromarker in Cajazeiras/Paraiba - Brazil, 2013

Utility of PADL in screening to detect leprosy cases.

A smaller subset of serum samples was evaluated with the PADL antigen. Of the 1620 individuals tested, 31.8% were positive for anti-PADL antibodies. 67% (349) of these seropositive subjects and 18.7% (207) of the seronegative subjects were invited for clinical examination. Fourteen individuals were not located and three individuals had died, such that a total of 556 individuals were examined, from which 15 subjects were diagnosed with leprosy (uncorrected 2.7%; 95% CI: 1.6–4.3; Table 3). Only two of these fifteen individuals had MB leprosy while thirteen (86.7%) had PB leprosy. Thirteen of the confirmed patients, including both MB patients, were positive for the anti-PADL antibodies. Thus, among confirmed patients, the sensitivity for PADL was 86.7% (95% CI: 62.5–97.7%). Two and zero cases were found in the PADL seronegative individuals sampled in the Sol Nascente and Capoeiras neighborhoods, respectively. For the population evaluated for anti-PADL responses, the PPV of seropositivity was 3.8% (13 patients among 361 seropositive) and NPP was 99.0% (2 patients among 212 seronegative) (Box 1).

There was no difference in the estimated prevalence rates between the two selected areas, with a corrected prevalence of 1.3% in Sol-Nascente (95% CI: 1.0–1.6%) whereas the neighborhood of Capoeiras had a corrected prevalence of 0.9% (95% CI: 0.7–1.1%). Again, adjusting to account for the different proportions of individuals in the population with positive and negative serology, the estimated prevalence of leprosy in the sampled region was 1.6% (95% CI: 1.4–1.9) (Table 3).

Área	PADL Index	Population Sampled		Sample Examined	Hansen cases		Estimated number of cases in the neighborhoods
		N	%		N	%	
Sol Nascente	Positive	360	4.3	240	7	2.9	60
	Negative	491	57.7	141	2	1.4	40
	Total	851		381	9	2.4	100
Capoeiras	Positive	155	20.2	109	6	5.5	62
	Negative	614	79.8	66	0	0.0	0
	Total	769		175	6	3.4	62
Overall	Positive	515	31.8	349	13	3.7	122
	Negative	1.105	68.2	207	2	1.0	40
	Total	1.620		556	15	2.7	162

Table 3 - Prevalence of Hansen's disease using PADL antigen as seromarker in Cajazeiras/Paraíba - Brazil, 2013

	Leprosy				LID-1 PADL		LID-1 (individuals with suspected lesions)
	Yes	No	Total				
LID-1				Sensitivity	89.5	86.7	89.5
Positive	17	473	490				
Negative	2	342	344	Specificity	42.0	37.9	45.2
Total	19	815	834				
PADL				Positive Predictive Value	3.5	3.8	23.0
Positive	13	336	349	Negative Predictive Value	99.4	99.0	95.9
Negative	2	205	207				
Total	15	514	556				
LID-1 Individuals With Suspected Cutaneous lesion							
Positive	17	57	74				
Negative	2	47	49				
Total	19	104	123				

Box 1 – Sensitivity, specificity positive and negative predictive values of serology using LID-1 and PADL antigens in Capoeiras and Sol-Nascente / Paraíba Brazil, 2013

Impact of other conditions on serum antibody responses.

Other ailments or infections could potentially impact the immune response, providing associations with antibody responses and/or leprosy. While associations between seropositivity for LID-1 or PADL and diabetes mellitus, allergy or history of tuberculosis were not observed, hypertension was associated with anti-PADL antibodies ($p < 0.001$; Table 4).

Comorbidity	LID-1		p	PADL		p
	Positive n=513	Negative n= 358		Positive n=359	Negative n= 212	
Allergy	24.2	19.3	0.09	23.1	23.1	1.00
Diabetes Mellitus	3.1	2.8	0.78	3.9	3.3	0.71
Tuberculosis	1.2	2.0	0.35	1.4	3.3	0.12
Hypertension	11.9	16.2	0.68	13.1	22.6	<0.01

Table 4: Association for LID-1 and PADL and comorbidities in the population sampled in Cajazeiras / Paraíba – Brazil, 2013

LID-1 – Leprosy IDRI Diagnostic – 1; PADL – Protein advances diagnostic of leprosy

Discussion

Over the past 25 years leprosy has declined worldwide from approximately 5.4 million cases in 1985 to 212.802 cases in 2008^{22,23}. However, Brazil, Nepal, East-Timor and other regions still report high rates of prevalence¹⁶. Several countries have implemented suitable programs for leprosy control and appear to have the disease under appropriate control, but others are not observing decreasing numbers as expected. Early diagnosis and treatment of leprosy are considered essential to interrupt the transmission of *Mycobacterium leprae* and to decrease the leprosy incidence. Due to the complex

response that characterizes the immunological spectrum of leprosy, however, it is likely that immunodiagnosis of leprosy can be achieved only by antigens that induce cellular and humoral responses⁹. The integration of a sensitive, specific and simple (and fast) to use tool to test for infection and/or disease is an ideal solution.

Our study integrated serum antibody detection measures with clinical examinations to assess their utility in leprosy surveillance programs aimed at actively finding cases. Our data indicate that the actual prevalence of leprosy in Sol-Nascente and Capoeiras neighborhoods are very high at around 1.1%. This represents approximately six times the case detection rate reported in these areas for the last five years. These findings are consistent with previous reports in which active case finding identified prevalence rates far higher than the numbers reported by simple attendance to clinics^{15,16,24,25}. Indeed, according to the World Health Organization criteria², this index makes Cajazeiras-PB a region with very high prevalence for leprosy, far above the stipulated elimination goal of 1 case per 10,000 individuals per year.

Based on prior experience, the expected frequency of MB leprosy for Cajazeiras-PB (32%)²⁶ was observed in this study. This is notable because it indicates that the active case finding program had no prejudice toward the clinical presentation. The recombinant antigens LID-1 and PADL had a high sensitivity in supporting and confirming leprosy diagnosis among the cases found in the survey population (89% and 87%, respectively), each failing to detect only two individuals with the PB form. Antibody responses to LID-1 have previously been shown to confirm more than 95% of LL patients at the MB end of the spectrum³¹. The seroreactivity of LID-1 for the PB form in this study was higher than other studies conducted in several locations, although the sample number is small^{8,10,27}. However, the specificity for clinical disease was low, respectively, 42% and 38%. In this context, it is necessary to emphasize that the low specificity rates in endemic regions could be due to either high exposure to, or asymptomatic infection with, *M. leprae* or due to cross-reactivity with *M. tuberculosis* and other mycobacteria, in addition to a potential impact of routine *M. bovis* BCG vaccination. However, several studies have shown that despite homology with other mycobacteria, these antigens do not exhibit cross-reactivity in field conditions^{29,30}. Hungria et al. indicated that the LID-1 antigen was not recognized by sera from most endemic control, tuberculosis patients or healthy household contacts of MB patients in Goiás/Brazil, an area with a high BCG vaccination coverage⁸. The low response rates among these groups were also observed in different endemic areas of leprosy in Pará and Mato Grosso/Brazil⁸. Considering our data alongside these other reports, it is likely that the observed seropositive rates reflect differing rates of asymptomatic *M. leprae* infection in these leprosy-endemic regions.

A very high NPV implies that having a negative test result virtually excludes the possibility of infection or disease. Thus, the NPV of 99% we observed for both LID-1 and PADL indicates that seronegativity markedly reduces the possibility of developing leprosy and virtually excludes MB leprosy. In contrast, the field research suggested low PPV for both LID-1 and PADL, at 3.5% and 3.7% respectively. The data indicate a requirement for approximately 30 seropositive individuals to be clinically examined to identify a single leprosy case. The presence of a suspect skin lesion, in conjunction with being seropositive for LID-1, increased the PPV to 23.0%. Although still fairly low, this information could be used by non-leprosy expert clinicians to streamline referrals to leprosy clinics. In a previous study of antibody responses analyzed retrospectively for

four years before the clinical diagnosis of MB leprosy, 7 of 11 (64%) MB cases showed the emergence of an IgG antibody response to LID-1 up to one year before the clinical diagnosis. The responses were notably higher and occurred earlier than the increases in response to anti-IgM PGL-I. Although the sample was small, a high anti-LID-1 IgG titer provided an indication of infection and active disease, as the antibody response in contacts that would not develop the disease, was generally low¹⁰. It should be noted that we obtained only a single measurement of each individual's antibody response, and given the extended time course of leprosy development, multiple measurements to assess alterations in these responses may increase the PPV.

Our study reveals the under-reporting of leprosy even within known endemic regions. By actively finding leprosy cases, our study revealed that the prevalence in Cajazeiras, PB, specifically in the neighborhoods of Capoeiras and Sol-Nascente, was six times greater than that detected during the years 2005-2010. Our results indicate that the lack of a serum antibody response to the recombinant antigens LID-1 and PADL can be used to exclude leprosy. Although the vast majority of detected leprosy cases were found in seropositive individuals, however, the presence of antigen-specific antibodies had limited utility for predicting disease in the municipality of Cajazeiras, PB / Brazil. Our data indicates that a large proportion of individuals may harbor asymptomatic *M. leprae* infection, however, and highlights the need for new diagnostic tools or strategies to detect both symptomatic leprosy and *M. leprae* infection that is progressing to disease. A follow-up of the subjects recruited in this study could clarify the evolution of serum antibody responses and provide further evidence that there is a higher incidence of leprosy in those seropositive for LID-1 and PADL.

References

- 1 World health organization (WHO). Global Strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: *plan period 2011-2015*; 2010. Geneva: WHO.
- 2 Oliveira MLW, Cavalière FA, Maceira JMP, Buher-Sekula S. O uso da sorologia como ferramenta adicional no apoio ao diagnóstico de casos difíceis de hanseníase multibacilar: lições de uma unidade de referência. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2008; 41 (2): 27–33.3
- 3 Stefani MM. Desafios na era Pós-genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008; 41(2):89-194.
- 4 Britton WJ, Lockood DN. Leprosy. *The lancet* 2004; 363;1209-1219.
- 5 Buher-Sekula S, Vissche J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, Oskam L. The ML flow test as point o care for leprosy control programmes: potential effects on classifications of leprosy patients. *Lepr Rev* 2007; **78**: 70–79.
- 6 Spencer JS, Kim HWV, Wheat H, Chatterjee D, Balagon MV, Cellona RV. Análise da resposta imunológica ao Mycobacterium leprae glicolipídeo fenólico I, lipoarabinomannan e Proteínas Recombinantes para definição de doença Perfis Sub-específicos antigênicos em Hanseníase. *Clin Vaccine Immunol* 2011; **18**(2): 260– 7.
- 7 Buher-Sekula S, Smits L, Gussenhoven JL, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1991-1995.

- 8 Hungria EM, Oliveira RM, Souza ALOM, Costa MB, Souza NB, Silva EA, Moreno FRV, Nogueira MES, Costa MRVN, Silva SMUR; Bühner-Sékula S, Steven RG, Sororeatividade ao novo *Mycobacterium leprae* antígenos de proteína em diferentes regiões endêmicas hanseníase no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; **107** (Supl.1): 104–111.
- 9 Geluk A, Duthie MS, Spencer JS. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. *Lepr Ver* 2011; **82**: 402–421
- 10 Duthie MS, Goto W, Ireton GC et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. *Clin Vaccine Immunol* 2007; **14**: 1400–1408.
- 11 Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath RM, Ito L, et al. Rational Design and Evaluation of a Multiepitope Chimeric Fusion Protein with the Potential for Leprosy Diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010; **17** (2): 298–303.
- 12 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (Brasil). [online]. [acesso em: 30 mar 2011] Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>.
- 13 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (Brasil). Departamento de Vigilância Epidemiológica. Hanseníase no Brasil: dados indicadores selecionados. Brasília – DF. 2009.
- 14 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (Brasil). Coordenação Geral de Planejamento e Orçamento. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde – Relatório de Situação – Paraíba. 5. ed. Brasília: 2011.
- 15 Gupte MDB, Murthy BN, Mahmood K, Meerlaksmi S, Nagaraju B, Prabhakaran R. Application of lot quality assurance sampling for leprosy elimination monitoring–examination of some critical factors. *Int J Epidemiol* 2004; **33**:344–348.
- 16 Moet FJRP, Schuring RP, Pahan D, Oskam L, Richardus JH. The prevalence of previously undiagnosed leprosy in the general population of northwest Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; **2**(2):198.
- 17 Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (Brasil). Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 6. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- 18 Ministério da Saúde (Brasil). Manual de prevenção de incapacidades: cadernos de prevenção e reabilitação em hanseníase. Brasília: 2008.
- 19 Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimento técnico em hanseníase baciloscopia. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília – DF. 2010.
- 20 Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Version 2.3.1. Disponível em: [www. OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com), updated 2011/23/06, accessed 2013/06/25.
- 21 Fletcher RH, Fletcher SW. Epidemiologia Clínica: elementos essenciais. Artmed 2006.
- 22 World Health Organization. Global leprosy situation, beginning of, 2008. *Wkly Epidemiol* 2008; Rec. **83**:293–300.
- 23 World Health Organization. Global leprosy situation, 2009. *Wkly Epidemiol Rec* 2009; **84**:333–340.
- 24 Bakker, M. I., M. Hatta, A. Kwenang, P. Van Mosseveld, W. R. Faber, P. R. Klatser, and L. Oskam. Risk factors for developing leprosy –a population- based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev* 2006; **7**:48–61. WORLD HEALT
- 25 Scheureuder, PA, Liben DS, Wahjuni S, J Van Den Broek, Soldenhoff R. A comparison of rapid Village Survey and Leprosy elimination Campaign, detection

- methods in two districts of East Java, Indonesia, 1977-1998 and 1999/2000. *Lep Rev* 2002; **73**: 336-375.
- 26 Organization (WHO). Global leprosy situation. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2005; 80:289-295.
 - 27 Ministério da Saúde (Brasil). Sistema de Informação de Agravos de Notificação – NET. Vigilância Epidemiológica. Cajazeiras: Secretaria de Saúde de Cajazeiras; 2012.
 - 28 Duthie MS, Ireton GC, Kanaujia GV, Goto W, Liang H, Bhatia A. Selection of Antigens and development of Prototype Tests for Point-of-Care Leprosy Diagnosis. *Clin vaccine immunol*, 2008; **15**:1590-1597.
 - 29 Sampaio LH, Stefani MMA, Oliveira RM, Sousa ALM, Ireton GC, Reed SG, Duthie MS Duthie. Immunologically reactive M. leprae antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. *BMC. Infet Dis* 2011;**11**:26.
 - 30 Geluk A, Klein MR, Franken KL, Van Meijgaarden KE, Wieles B, Pereira KC. et al. Postgenomic approach to identify novel Mycobacterium leprae antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. *Inf Immunol* 2005; **73**:5636-5644.
 - 31 Duthie MS, Truman RW, Goto W, Donnell JO, Hay MN, Spencer JS. Visão para o diagnóstico precoce da hanseníase por meio de análise das respostas de anticorpos em desenvolvimento de Mycobacterium leprae de tatus-infectados. *Clin Vaccine Immunol* 2011; **18** (2):254-259.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram:

1. Os indivíduos diagnosticados com hanseníase foram em média de idade, 4 anos mais jovens e de menor proporção do sexo masculino do que a população geral e amostra examinada.
2. A prevalência corrigida para Capoeiras e Sol-Nascente, dois bairros de maior taxa de notificação de Cajazeiras é de 1,1% utilizando o LID-1 como marcador semelhante à prevalência de 1,6% utilizando o marcador PADL.
3. A prevalência corrigida de hanseníase em Cajazeiras-PB, especificamente, nos bairros Sol Nascente e Capoeiras foi seis vezes maior que os índices de detecção durante os anos de 2005 a 2010.
4. Os antígenos recombinantes LID-1 e PADL foram eficientes em excluir a hanseníase (VPN = 99%) nos indivíduos negativos para um ou outro teste. Os biomarcadores foram ineficientes como indicadores de doença.
5. Os indivíduos que apresentaram lesão cutânea, sem realizar o exame clínico (dermatoneurológico), aumentaram pouco o VPP, porém ainda restaram dúvida em $\frac{3}{4}$ dos indivíduos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de algumas dificuldades e limitações, este estudo alcançou os objetivos propostos, pois possibilitou determinar a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o negativo da proteína de fusão LID-1 e PADL em um município hiperendêmico para a hanseníase.

Dentre as dificuldades encontradas durante o estudo podemos citar a falta de interesse, o medo e o estigma dos indivíduos em se submeterem aos exames laboratoriais, para elucidação do diagnóstico, sendo necessário, muitas vezes, ir à procura e levá-los aos serviços de saúde. Contudo, vale ressaltar que, mesmo com o medo, os sujeitos envolvidos também prestaram solidariedade e carinho para com a nossa equipe, nos momentos difíceis, orientando-nos e acompanhando a busca de outros participantes, uma vez que a mudança de endereço deles era constante. Uma outra limitação foi também a falta do antígeno recombinante PADL para o exame sorológico em todos os indivíduos-alvo e a falta de evidenciação do bacilo em todos os indivíduos.

Outro desafio foi a falta de estrutura adequada dos serviços de saúde para a realização das atividades. No entanto, não podíamos deixar de mencionar a participação da comunidade Acadêmica do Centro de Formação de Professores- CFP, docentes e discentes que tinham o interesse em colaborar para a realização deste estudo.

O estudo evidenciou, ainda, a necessidade de se buscar novas e melhores ferramentas diagnósticas tanto para a hanseníase como para prevenção de infecção para a doença.

7 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Os conhecimentos e experiências adquiridos nesta pesquisa, fazem-nos refletir e procurar colocar em prática atividades relacionadas a esta temática:

Envolver estudantes e docentes da graduação dos cursos de Medicina e Enfermagem; médicos e enfermeiros da Universidade Federal de Campina Grande do CFP em grupos de estudo e pesquisa, incentivando cada vez mais os discentes, para participarem nos programas institucionais de iniciação científica (PIBIC e PIVIC).

Enfim, divulgar as informações das pesquisas em andamento e de outras futuras, a fim de aprimorar a qualidade e a quantidade dos instrumentos e procedimentos disponíveis para o controle da hanseníase. Pesquisa em andamento: HANSENÍASE: Vigilância dos contatos intradomiciliares de casos diagnosticados na busca ativa em município hiperendêmico. Projeto de pesquisa para o futuro: Um acompanhamento, a longo prazo, dos indivíduos do estudo para esclarecer a real interpretação da soropositividade dos antígenos LID-1 e PAD, ou seja se realmente baixa especificidade ou preditor da doença.

APÊNDICE A**FICHA DE COLETA DE DADOS – EXAME FÍSICO**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

NOME:

ENDEREÇO / MUNICÍPIO:

DATA DE NASCIMENTO:

GÊNERO:

OCUPAÇÃO:

NOME DA MÃE:

NÚMERO DE PRONTUÁRIO (se houver):

ESF ao qual está vinculado: Sol Nascente () Amélio Estrela ()

ANAMNESE: o paciente tem queixas em relação à pele? SIM () NÃO () QUAIS?

Qual o tempo de evolução desta queixa?

Relaciona com algum fator (Frio? Calor? Exposição ao sol? Alimentação? Viagens, Banhos de rio, Mar ou Piscina?)

Há outras pessoas acometidas na família ou conviventes?

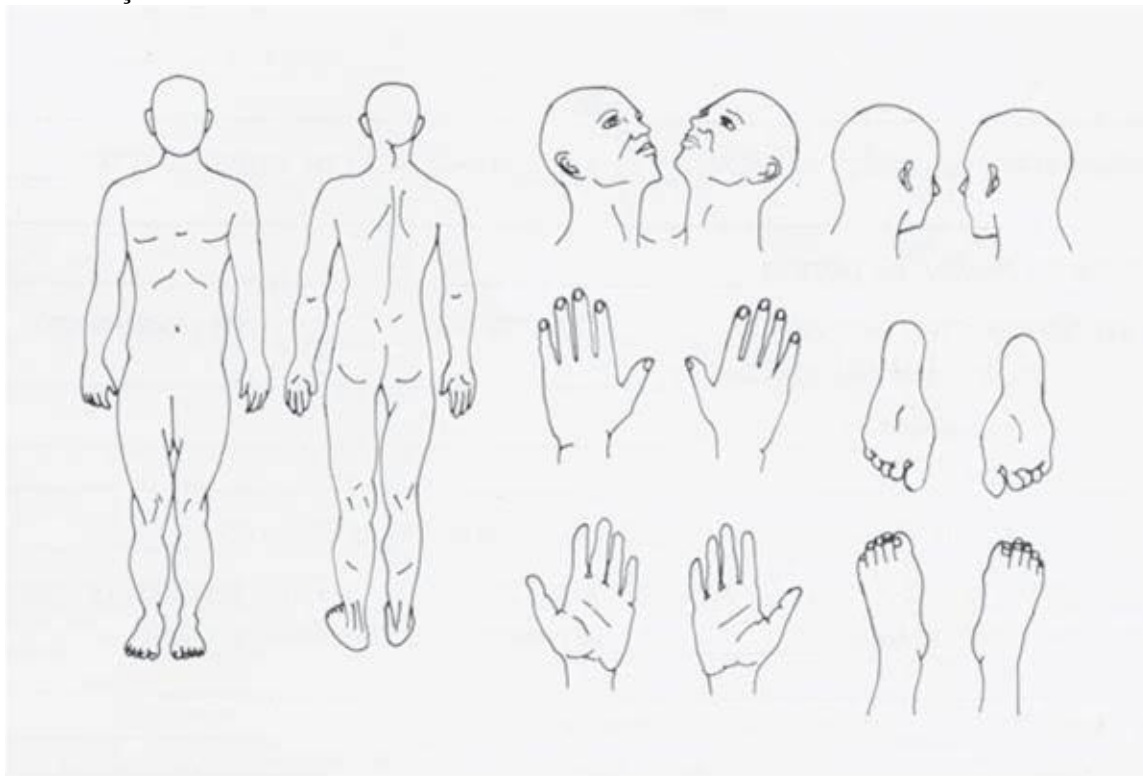
Fez uso, regular ou eventual, de medicamentos orais ou parenterais, para esta ou quaisquer outras patologias (nomes e dosagens)?

Já teve hanseníase? SIM () NÃO () Quando?

Tem hanseníase? SIM () NÃO ()

Está em tratamento? MB () PB ()

Distribuição das lesões:



Fonte: BRASIL, 2002.

Foi realizado teste de sensibilidade? NÃO () SIM ()

Se sim, como foi realizado? Em que localizações? Descreva.

NOME DO EXAMINADOR:

DATA DO EXAME:

APÊNDICE B

CONSENTIMENTO INFORMADO LIVRE ESCLARECIDO

PROJETO: "ACURÁCIA DA PROTEÍNA DE FUSÃO LID-1 PARA O DIAGNÓSTICO DE HANSENIASE EM UMA REGIÃO DE ALTA INCIDÊNCIA"

Durante a leitura do documento abaixo fui informado (a) que posso interromper para fazer qualquer pergunta, com objetivo de tirar dúvidas e o meu melhor esclarecimento.

Eu, _____ declaro ter sido informado (a) sobre os objetivos do trabalho de pesquisa ACURÁCIA DA PROTEÍNA DE FUSÃO LID-1 PARA O DIAGNÓSTICO DE HANSENIASE EM UMA REGIÃO DE ALTA INCIDÊNCIA ". Fui informado (a) também sobre os possíveis riscos ou desconforto, benefícios e os meus direitos. Fui informado (a) que os meus dados serão mantidos em sigilo, sendo utilizados, resguardando a minha identificação, para fins de publicações científicas em revistas especializadas e de relatórios técnicos dirigidos para organizações de saúde e instituições de pesquisa, ou seja, os dados serão publicados em revista médica sem constar o meu nome (ou iniciais do meu nome) e o meu endereço. Fui informado (a) que no caso de decidir não participar da pesquisa não sofrerei qualquer tipo de prejuízo quanto a tipo e qualidade da assistência, não havendo modificação do esquema de medicamentos usados para tratar minha doença.

Além de ter acesso às informações escritas que seguem abaixo, tive também a oportunidade de fazer perguntas para saber mais sobre a pesquisa.

O trabalho atual tem como objetivo determinar a sensibilidade e especificidade de uma proteína de fusão LID-1 em áreas de alta incidência de hanseníase em Cajazeiras, Paraíba. Caso concorde que você ou seu filho menor de 18 anos em participar deste estudo, um membro da equipe do projeto, coordenado pela profa. Marilena Maria de Souza, enfermeira da Universidade Federal de Campina Grande/Escola Técnica de Saúde de Cajazeiras, fará perguntas sobre nome, sexo, idade, escolaridade, estado civil, renda familiar, ocupação, religião, endereço, etnia, contato de doentes de hanseníase.

Neste estudo vamos colher amostra de sangue de no máximo 10 ml para testar a reação de algumas das células de seu sangue a antígenos (pequenas partes do micróbio que pode provocar a doença em você – *Micobacterium Leprae*, para determinar se ele pode vir a ser um bom teste diagnóstico. Estes antígenos foram isolados no ISRI (Instituto de Investigação de Doenças Infecciosas dos Estados Unidos) utilizando um novo método do ensaio com o sangue. Procuraremos utilizar a mesma punção venosa para colhermos sangue para exames, usando seringas descartáveis e que depois serão jogadas no lixo seletivo. Pode ocorrer sensação de DOR durante o ato de colher o sangue na veia do braço e vermelhidão no local. Não será injetado nada no seu sangue. Se você apresentar qualquer dano físico como resultado direto da retirada do sangue em estudo, deverá entrar em contato com a profa. Marilena Maria de Souza e Rogéria Mônica Xavier Seixas de Abreu, enfermeiras da UFCG e da Secretaria de Saúde do Município de Cajazeiras (83) 3531 5200; (83) 3532 2000 e será disponibilizado acompanhamento nas Unidades Básicas de Saúde do Município de Cajazeiras, caso haja necessidade.

Se o teste de diagnóstico for positivo, outros exames laboratoriais deverão também ser realizados, como exame físico, baciloscopia e biópsia. Os resultados de teste diagnóstico negativo serão sorteados para serem submetidos também aos exames referidos. Os resultados serão comunicados aos participantes do estudo.

Pode não haver benefícios para você por se tratar de um exame diagnóstico, mas se houver você será comunicado do resultado. Pode haver, no entanto, benefícios para outros pacientes, um teste de diagnóstico melhor e mais eficiente ou até um novo tratamento

A sua participação neste estudo é voluntária. A qualquer momento você poderá decidir não continuar no estudo.

Se você tiver alguma dúvida sobre este protocolo ou seus direitos como participante de pesquisa ou depois do estudo, você pode contactar com a profa. Marilena Maria de Souza e Rogéria Mônica Xavier Seixas de Abreu, enfermeiras da UFCG e da Secretaria de Saúde do Município de Cajazeiras (83) 3531 5200; (83) 3532 2000.

Caso tenha dificuldade para ler este documento, será feita a leitura do mesmo de forma pausada por um membro da equipe, esclarecendo todas as dúvidas, que você tiver sobre a pesquisa. Se você está plenamente satisfeito com as explicações sobre esta pesquisa e concorde em participar da mesma, deverá assinar (ou colocar sua impressão digital) este termo de consentimento autorizando sua participação neste estudo.

Cajazeiras __/__/__

NOME: _____

Assinatura → **Ou** (impressão digital ou datiloscópica).

Testemunhas:

1. NOME:

Assinatura →

2. NOME:

Assinatura →

ANEXO A



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - CEP
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - UFCG
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO ALCIDES CARNEIRO - HUAC



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que em reunião de 27/ 10/ 2010 foi aprovado por unanimidade o Projeto de Pesquisa: Acurácia da Proteína de Fusão LID – 1 para o Diagnóstico de Hanseníase em uma Região de Alta Incidência. Projeto a ser realizado no período de: Janeiro de 2011 a Junho de 2013.

Estando o pesquisador ciente de cumprir integralmente os itens da Resolução nº. 196/ 96 do Conselho Nacional de Saúde – CNS, que dispõe sobre Ética em Pesquisa que envolve seres humanos, podendo sofrer penalidades caso não cumpra com um dos itens da resolução supra citada.

Após conclusão da pesquisa deve ser encaminhado ao CEP/ HUAC, em 30 dias (trinta dias), relatório final de conclusão, antes de envio do trabalho para publicação. Haverá apresentação pública do trabalho no Centro de Estudos HUAC em data a ser acordada entre pesquisador e CEP/ HUAC.

Relator (a):
Benedito Antonio Luciano

Karynna Nóbrega

Karynna Magalhães Barros da Nóbrega
Coordenadora CEP/ HUAC/ UFCG.

Campina Grande - PB, 27 de Outubro de 2010.

Rua.: Dr. Carlos Chagas, s/ n, São José, Campina Grande – PB.
Telefone.: (83) 2101 – 5545. E-mail.: cep@huac.ufcg.edu.br

ANEXO B – NORMAS DE FORMATAÇÃO DA REVISTA LANCET

Information for Authors

The Lancet Infectious Diseases considers any original research contribution that advocates change in or illuminates infectious disease clinical practice and informative reviews on any topic connected with infectious diseases. Because the journal has an international readership from a wide range of specialties, it is vital that articles should be written clearly and should not assume a level of knowledge above that of, say, a reasonably well-read, recently qualified, doctor in training. One way to find out if your article is understandable to those reading outside their immediate field of interest is to show the manuscript to colleagues in other specialties. If they find it difficult to follow, so will a good proportion of the readership. Wherever possible, figures and good quality photographs (colour or black and white) should be used to supplement and to enhance the text. Further details on the different sections of *The Lancet Infectious Diseases*, and how to submit to the journal, are provided below. If you require further clarification, the journal's editorial staff will be pleased to help (email IDeditorial@lancet.com).

Manuscripts must be solely the work of the author(s) stated, must not have been previously published elsewhere, and must not be under consideration by another journal. *The Lancet* journals are signatories of the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), issued by the International Committee for Medical Journal Editors (ICMJE), and to the Committee on Publication Ethics (COPE) code of conduct for editors. We follow [COPE's guidelines](#).

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals
<http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/icmje.pdf>
COPE Code of Conduct
http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf

How to submit your paper Manuscript submission

Manuscript submission to all *Lancet* journals is free. Manuscripts should be submitted online via the *The Lancet Infectious Diseases'* online submission and peer review website (known as EES) at <http://ees.elsevier.com/thelancetid>

- Simply log on to EES and follow the onscreen instructions for all submissions
- If you have not used EES before, you will need to register first. In EES, the corresponding author is the person who enters the manuscript details and uploads the submission files
- Inclusion of illustrations (photographs, graphs, diagrams etc) is a prerequisite for publication. Submission of original and editable artwork files is encouraged. Digital photography files should have a resolution of at least 300 dpi and be at least 107 mm wide
- In almost all cases, if you have a finished manuscript, you should submit it, rather than contacting *The Lancet Infectious Diseases* to enquire whether an unseen manuscript is likely to be accepted. Unless you have been asked by The Editor to submit by email, you should use the online system for all types of submission, including Correspondence
- If you have any technical problems or questions, please contact our dedicated customer support (available 24 h a day, 365 days a year):

For the Americas: +1 888 834 7287 (toll-free in USA and Canada)
For Asia and Pacific: +81 3 5561 5032
For Europe and rest of the world: +353 61 709190
Email: IDeditorial@lancet.com

Covering letter

- You should upload your covering letter at the "Enter Comments" stage of the online submission process
- Use the covering letter to explain why your paper should be published in *The Lancet Infectious Diseases*—the leading international infectious diseases journal—rather than elsewhere
- It is helpful to indicate what could shorten your paper—the full paper can be reviewed and a shorter version published; a table or figure, details of a DNA sequence, or further references, for

example, can be published on our website or made available from the authors

First submissions to *The Lancet Infectious Diseases* should include:

- 1 Covering letter
- 2 Manuscript including tables and panels
- 3 Figures
- 4 Authors' contributions statement (see next section)
- 5 Conflicts of interest and source of funding statements (see next section)
- 6 In-press papers—one copy of each with acceptance letters
- 7 Protocols and CONSORT details for randomised controlled trials (see Articles)
- 8 We encourage disclosure of correspondence from other journals and reviewers, if previously submitted, and we might contact relevant editors of such journals

Statements, permissions, and signatures

Authors and contributors

- All authors, and all contributors (including medical writers and editors), should specify their individual contributions at the end of the text
- *The Lancet Infectious Diseases* will not publish any paper unless we have the signatures of all authors
- We suggest you use the [author statement form](#) and either upload the signed copy with your submission, or fax to +44 (0) 1865 853 016
- Please include written consent of any cited individual(s) noted in acknowledgments or personal communications

Author signatures, contributions, and declarations
<http://download.thelancet.com/flatcontentassets/authors/tlid-author-signatures.pdf>

Conflicts of interest

A conflict of interest exists if authors or their institutions have financial or personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their actions. Financial relationships are easily identifiable, but conflicts can also occur because of personal relationships, academic competition, or intellectual passion. A conflict can be actual or potential, and full disclosure to the Editor is the safest course. Failure to disclose conflicts might lead to publication of a correction or even to

ANEXO C – Normas de formatação da Revista Brasileira de Medicina (RBM)**Moreira Jr Editora**

Rua Henrique Martins 493
04504-000 - São Paulo - SP
Telefone: (11) 3884-9911

**NORMAS DE PUBLICAÇÃO NA REVISTA
BRASILEIRA DE MEDICINA (RBM)**

1. Serão publicados artigos originais, notas prévias, relatórios, artigos de revisão e de atualização em língua portuguesa ou inglesa, devendo a ortografia portuguesa seguir a oficial. Poderão ser republicados artigos em condições especiais.

2. Os trabalhos em língua portuguesa devem vir acompanhados, pelo menos, por um título, título em inglês, unitermos, *uniterms* e um resumo em língua inglesa para fins de cadastramento internacional.

3. Os trabalhos recebidos pelo Editor serão analisados pela Assessoria do Conselho Editorial. Pequenas alterações de "*copy desk*" poderão ser efetivadas com a finalidade de padronizar os artigos, sem importarem em mudanças substanciais em relação ao texto original.

4. Os trabalhos devem ser enviados através do e-mail: redacao@moreirajr.com.br

Obs: também podem ser encaminhados em CDs e em duas vias impressas. O processador de texto utilizado deve ser qualquer programa compatível com Windows (Word, Write etc.) Deve ser assinalado no CD qual o programa empregado e o nome do arquivo correspondente ao trabalho.

5. O trabalho deverá ter, obrigatoriamente:

a) título (com tradução para o inglês);

b) nome completo dos autores;

c) citação do local (endereço completo) onde fora realizado o trabalho;

d) títulos completos dos autores;

e) unitermos em português e inglês;

f) resumo do trabalho em português, sem exceder o limite de 250 palavras. Deverá conter, quando tratar-se de artigo original, objetivo, métodos, resultados e conclusão;

- g) introdução;
- h) material ou casuística e método ou descrição do caso;
- i) resultados;
- j) discussão e/ou comentários (quando couber);
- l) conclusões (quando couber);
- m) *summary* (resumo em língua inglesa), consistindo na correta versão do resumo, não excedendo 250 palavras;
- n) referências bibliográficas (como citadas a seguir no item 8) em ordem de entrada;
- o) as ilustrações anexas devem seguir regulamentação apropriada, descrita no item 7.

6. Caberá ao Editor julgar textos demasiadamente longos, suprimindo – na medida do possível e sem cortar trechos essenciais à compreensão – termos, frases e parágrafos dispensáveis ao correto entendimento do assunto. O mesmo se aplica às ilustrações excessivamente extensas, que possam ser consideradas parcial ou totalmente dispensáveis.

Em trabalhos prospectivos, envolvendo seres humanos, é considerada fundamental a aprovação prévia por um Comitê de Ética, devendo o trabalho seguir as recomendações da Declaração de Helsinki. Os pacientes devem ter concordado com sua participação no estudo.

7. Ilustrações: constam de figuras, tabelas, quadros e gráficos, referidos em números arábicos (exemplo: Figura 3, Gráfico 7), sob a forma de desenhos a nanquim, fotografias ou traçados (ECG etc.). Se forem “escaneadas”, deverão ser enviadas em formato .tif ou .jpg e ter, no mínimo, 270 dpi de resolução. Quando possível deverão ser enviadas em forma original. Somente serão aceitas as ilustrações que permitirem boa reprodução. Não devem ser coladas no meio do texto do artigo e, sim, em folhas anexas com as respectivas legendas datilografadas na parte inferior da mesma (uma folha para cada ilustração). Deve-se tomar o cuidado de numerar cada ilustração no verso da mesma e indicar o correto lugar onde deve ser inserida. Tabelas e quadros serão referidos em números arábicos, constando sempre o respectivo título, de maneira precisa. As tabelas e quadros dispensam sua descrição no texto e têm a finalidade de resumir o artigo. As unidades utilizadas para exprimir os resultados (m, g, g/100, ml etc.) figurarão no alto de cada coluna. Caberá ao Editor julgar o excesso de ilustrações (figuras, quadros, gráficos, tabelas etc.), suprimindo as redundantes.

8. As referências bibliográficas devem seguir a ordem de aparecimento no texto. Utilizar o estilo e formato baseados nos

usados pela Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos no *Index Medicus* (de acordo com o estilo Vancouver – COMITÊ INTERNACIONAL DE EDITORES DE PERIÓDICOS MÉDICOS).

a) Artigo de revista - sobrenomes e iniciais de todos os autores (de sete ou mais, apenas os três primeiros, seguidos de *et al.*) - Título do artigo. Nome da revista abreviada Ano; Volume: página inicial-página final.

Exemplo: Vega KJ, Pina I, Krevsky B. - Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996;124:980-3.

b) Para citação de outras fontes de referência, consultar os Requisitos Uniformes para Manuscritos submetidos a Periódicos Médicos. *New Engl J Med* 1997; 336(4):309-15.

9. Os nomes de medicamentos citados no texto (nomes de fantasia, oficiais, patenteados, químicos e siglas de pesquisa) devem obedecer à regulamentação correspondente da Organização Mundial da Saúde.

10. De acordo com a resolução 1.595 do Conselho Federal de Medicina, os autores devem declarar os agentes financeiros que patrocinam suas pesquisas, como agências financiadoras, laboratórios farmacêuticos etc.

11. Os autores receberão exemplares da edição em que seu trabalho foi publicado (a título de separatas), que lhes serão enviados diretamente ao local em que o trabalho fora realizado. Separatas deverão ser encomendadas e previamente combinadas com a Direção Comercial.

12. Os trabalhos que não se enquadrem nas normas acima ou que não se adequem às necessidades editoriais da revista poderão ser reencaminhados aos autores para que procedam às necessárias adaptações que serão indicadas em carta pessoal do Editor.

Serão citadas as datas do recebimento do trabalho e aprovação do mesmo para publicação, a fim de salvaguardar os interesses de prioridade do autor. No caso de reencaminhamento do trabalho para adaptação às nossas normas de publicação, a data citada de recebimento será sempre a do primeiro encaminhamento do trabalho.