

Uso do teste ML-Flow como auxiliar na classificação e tratamento da hanseníase *

Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy

Leticia Arsie Contin ¹

Leticia Fogagnolo ¹

Jaison Antônio Barreto ²

Maria Esther Nogueira ⁴

Cynthia Janine Meira Alves ¹

Priscila Wolf Nassif ¹

José Roberto Pereira Lauris ³

Resumo: FUNDAMENTOS: O tratamento da hanseníase é definido pela classificação de pacientes em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB). A OMS (Organização Mundial de Saúde) classifica os doentes de acordo com o número de lesões, mas Ridley-Jopling (R&J) utiliza também exames complementares, porém é de difícil utilização fora dos serviços de referência. Em 2003 foi desenvolvido um teste denominado ML-Flow, uma alternativa à sorologia por ELISA para auxiliar na classificação de pacientes em PB e MB e auxiliar na decisão terapêutica.

OBJETIVOS: Observar a concordância entre o teste de ML-Flow e baciloscopia de linfa, exame já consagrado para detecção de MB. Analisar a utilidade do teste de ML-Flow em campo.

MATERIAL E MÉTODOS: Estudo retrospectivo avaliando prontuário de 55 pacientes virgens de tratamento, diagnosticados como PB ou MB por R&J. Submetidos à baciloscopia e ao teste de ML-Flow.

RESULTADOS: Nos MB, a baciloscopia foi positiva em 80% dos casos, o ML-flow foi positivo em 82,5%. Entre os PB, o ML-Flow foi positivo em 37,5% e a baciloscopia do esfregaço foi negativa em 100% dos casos. A concordância entre os resultados da baciloscopia do esfregaço e ML-Flow foi de 87,5%, kappa=0,59, p<0,001.

CONCLUSÃO: Nenhum teste laboratorial é 100% sensível e específico para a correta classificação de todas as formas de hanseníase. O ML-Flow é um teste rápido, de fácil manuseio em campo, menos invasivo que a baciloscopia podendo ser útil para auxiliar na decisão terapêutica em locais de difícil acesso a serviços de referência.

Palavras-chave: Classificação; Hanseníase; Organização Mundial da Saúde

Abstract: BACKGROUND: The treatment of leprosy is defined by the classification of patients as paucibacillary (PB) or multibacillary (MB). The WHO (World Health Organization) classifies patients according to the number of lesions, but Ridley-Jopling (R & J) also uses complementary exams, which are difficult to use outside reference services. In 2003, a test called ML-Flow, an alternative to Elisa serology, was developed to help classify patients as PB or MB and decide about their treatment.

OBJECTIVES: To assess the agreement between the ML-Flow test and slit skin smears, already largely used for MB detection, and to observe the efficacy of the ML-Flow test in the field.

MATERIAL AND METHODS: A retrospective study evaluating the medical records of 55 patients who had not undergone previous treatment, diagnosed as PB or MB according to R & J and subjected to slit skin smears and the ML-Flow test.

RESULTS: In MB patients, slit skin smears were positive in 80% of the cases, the ML-flow was positive in 82.5%. Among PB patients, the ML-Flow was positive in 37.5% and slit skin smears were negative in 100% of the cases. The agreement between skin smear and ML-Flow results was 87.5%, with a kappa value of 0.59, p <0.001.

CONCLUSION: No laboratory test is 100% sensitive and specific for the correct classification of all forms of leprosy. The ML-Flow test is faster, easier to use, and less invasive than slit skin smears and therefore may be useful when making therapeutic decisions in areas of difficult access to reference services.

Keywords: Classification; Leprosy; World Health Organization

Recebido em 10.10.2009.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 09.12.10.

* Trabalho realizado no Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) – Bauru (SP), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / *Conflict of interest: None*

Suporte financeiro: Nenhum / *Financial funding: None*

¹ Médico (a) dermatologista – Bauru (SP), Brasil.

² Mestre - Médico e preceptor da residência médica do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) – Bauru (SP), Brasil.

³ Livre-Docente - Professor Associado do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB – USP) – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Doutora em Patologia - Pesquisadora Científica V, Chefe da Equipe de Imunologia do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) – Bauru (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma infecção crônica causada pelo *M. leprae*? afeta principalmente a pele e nervos periféricos, apresenta aspectos clínicos variados e muitas vezes de difícil reconhecimento¹. Acomete particularmente a população menos favorecida em países onde a doença é endêmica². Seu diagnóstico é primordialmente clínico, baseado na presença de lesão hipopigmentada ou avermelhada com perda de sensibilidade térmica, dolorosa ou eventualmente tátil, acompanhada ou não de espessamento de nervo periférico com perda de sensibilidade no local da inervação³.

A maioria dos pacientes pode ser diagnosticada por meio da presença de lesão anestésica, porém 30%, incluindo vários multibacilares, não apresentam esta manifestação clínica⁴, o que dificulta o diagnóstico e quebra da cadeia de transmissão.

Classificar pacientes em paucibacilares (PB) e multibacilares (MB) é de grande importância, pois o tratamento difere para os dois grupos.

Os métodos de classificação das formas clínicas da hanseníase mudaram significativamente durante os anos. Em 1953 foi desenvolvida a classificação de Madrid, a qual foi utilizada em campo até pouco tempo atrás. Dividia os pacientes PB em Indeterminados - MHI (forma inicial da doença) e Tuberculóides - MHT (pólo resistente), e os MB em Borderline ou Dimorfos - MHD (imunidade parcial) e Lepromatosos ou Virchowianos - MHV (virtualmente anérgicos).

Em 1962 e 1966, Ridley e Jopling (R&J) propuseram uma classificação da hanseníase em 5 grupos, baseada em critérios clínicos, imunológicos e histopatológicos, a qual é utilizada até hoje em muitos centros de referência e principalmente por pesquisadores.

Ridley, em 1971, após a revisão da classificação de 5 grupos, formulou a classificação "5 de 7 grupos", onde reconhece dois tipos polares e imunologicamente estáveis, denominados Tuberculóide polar (TTp) e Virchowiano polar (LLp) e os interpolares, imunologicamente instáveis, denominados Tuberculóide secundário (TI ou Ts), Borderline-tuberculóides (BT), Borderline-borderline (BB), Borderline-virchowianos (BL) e o virchowiano subpolar (LI ou LLsp).^{6,7}

Como esta classificação é impraticável em campo, em 1982 a OMS (Organização Mundial de Saúde) definiu como pacientes PB os Indeterminados, os TT e os BT com índice bacteriológico menor do que dois, e MB os demais⁸, apesar de ter conhecimento que, frequentemente, a baciloscopia realizada em campo apresentava baixa qualidade ou era indisponível⁹.

Por este motivo, em 1995 a OMS propôs sepa-

rar pacientes PB de MB pelo critério de número de lesões, sendo PB os que apresentavam até 5 lesões e os MB aqueles com 6 ou mais lesões.¹⁰

Estudos demonstram que pela classificação operacional proposta pela OMS alguns pacientes são tratados inadequadamente e predispostos a reações por tempo indeterminado, e podendo gerar reativação da doença ou até mesmo resistência secundária.^{11,12}

Exames laboratoriais (histopatologia, reação de Mitsuda, baciloscopia do esfregaço cutâneo e sorologia) podem ser utilizados para auxiliar na correta classificação destes pacientes, quando disponíveis, principalmente nos centros de referência. Estes, todavia, não estão disponíveis para a maior parte dos serviços de saúde.

Em 2003 foi descrito por *Bübrer Sékula et al.* um método alternativo ao ELISA (sorologia) para detecção de anticorpos IgM anti PGL-1 denominado ML-Flow. Não é um método diagnóstico e sim um exame para classificar pacientes em PB e MB e auxiliar na decisão terapêutica. Não parece apresentar reação cruzada com outras micobacterioses.¹³

OBJETIVOS

Observar a concordância entre o teste de ML-Flow e baciloscopia do esfregaço intradérmico.

Observar a utilidade do teste de ML-Flow em campo para auxiliar na decisão terapêutica dos pacientes com hanseníase.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados, em um estudo retrospectivo, os prontuários de 55 pacientes com hanseníase diagnosticada entre janeiro de 2004 e dezembro de 2007, virgens de tratamento, no ambulatório do Instituto Lauro de Souza Lima. A faixa etária dos pacientes variou de 5 a 83 anos, sendo 36 do sexo masculino e 19 do sexo feminino, todos procedentes do Estado de São Paulo. Foram excluídos os casos procedentes de outros estados por dificuldade de retorno para avaliação dos exames e seguimento clínico.

Os casos foram incluídos quando analisados por critérios clínicos iniciais e submetidos aos seguintes exames: histopatológico analisando aspecto histológico e índice baciloscópico (IBB), reação de Mitsuda, ocorrência de reações borderline ou de eritema nodoso durante a evolução (por um período de seguimento de cinco anos em média), baciloscopia do esfregaço intradérmico (BEI) (em lesão se presentes e em pontos-índice se ausentes), realizados na instituição. (Ridley & Jopling e outros exames complementares). Foram considerados PB os MHT e MHI e MB os MHD e MHV¹⁴.

Todos foram então submetidos ao ML-Flow, que consiste em um teste imunológico composto por uma fita de nitrocelulose que apresenta, de um lado, uma superfície contendo anticorpos IgM marcados com ouro e no outro lado, uma superfície de absorção. Um trissacarídeo semi-sintético similar ao PGL-1, ligado à albumina humana, é usado como antígeno em linha de 1 mm na superfície da fita. Em paralelo a esta linha, conjugado IgM humano é usado como controle. Uma amostra de sangue ou soro é colocada no receptáculo de amostras e é carregada com o fluido da amostra. O reagente se liga ao IgM da amostra. Se o anticorpo for específico ele se ligará ao antígeno e uma linha vermelha aparecerá na zona de teste. Caso contrário apenas a linha zona de controle aparecerá positiva. O teste é considerado negativo quando não se forma uma linha ou quando esta é pálida. O teste é considerado positivo e graduado de 1 a 4 + de acordo com a intensidade de coloração na linha do teste¹³.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra a classificação clínica, resultado de baciloscopia de esfregaço intra-dérmico (BEI) e ML-Flow de pacientes que preencheram critérios de inclusão neste estudo. O ML-Flow foi positivo em 82,5% dos MB e a BEI, em 80%. Entre os PB, ML-Flow mostrou-se positivo em 37,5% dos pacientes, a BEI foi negativa em 100% dos casos.

A tabela 2 mostra concordância entre a BEI e ML-Flow em pacientes MB de 87,5%, kappa=0,59, p<0,001.

DISCUSSÃO

A BEI é o exame normalmente realizado para confirmar o diagnóstico operacional de hanseníase, ajuda na distinção entre PB e MB. Necessita, porém, de pessoal treinado para coleta e leitura e é um teste relativamente invasivo¹⁵.

Apresenta alta especificidade, porém baixa sensibilidade devido a erros de coleta, fixação e leitura, sendo normalmente negativa em muitos pacientes BT e sempre negativa nos casos

neural puro - dimorfos. Nestas duas últimas situações, a BEI é negativa, ou seja, a classificação operacional baseada apenas neste exame seria PB, mas a histopatologia mostra rica baciloscopia dentro dos ramos nervosos dérmicos ou nervos sensitivos periféricos¹². Gallo et al.¹⁶ em 2003 observaram uma concordância entre o método clínico do número de lesões (OMS) e resultado da BEI de 83,8%, sendo a sensibilidade relativa do exame de 89,6%, especificidade relativa de 89,6%, valor preditivo positivo de 95,1% e valor preditivo negativo de 69,5%. Já Crippa et al.¹⁷ em 2004 encontraram uma sensibilidade de 73,6% da baciloscopia em relação ao exame físico, especificidade de 85,6%, valor preditivo positivo de 66,8% e valor preditivo negativo de 89,1%.

A BEI foi positiva em 33 casos de MB submetidos a este exame nesta série(82,5%) e foi negativa em todos os PB (100%) (Tabela 1).

Anticorpos para o PGL-I, principalmente do tipo IgM, são considerados específicos para o *M. leprae* e são encontrados em pacientes com hanseníase, mas também podem ocorrer em baixos títulos em pessoas expostas. Os anticorpos não conferem proteção e indicam infecção pelo *M. leprae*¹. A grande maioria dos pacientes PB é soronegativa, assim como a maioria dos MB é soropositiva¹³.

O ELISA anti PGL-I é um método para detecção destes anticorpos, sendo utilizado para auxílio na classificação operacional, na detecção de recidivas e de pessoas com maior risco de desenvolver hanseníase, e para seguimento destes pacientes. Porém, exige pessoal treinado, material específico e pelo menos um dia de espera para obtenção dos resultados e o material utilizado necessita ser guardado em ambiente refrigerado^{1,4}.

TABELA 1: Comparação entre a classificação baseada no número de lesões de pele, resultados do teste ML Flow e exame baciloscópico de esfregaço intradérmico (BEI)

Classificação baseada número de lesões OMS	Testes confirmatórios				
	ML Flow	BEI	N	%	
PB	POS	NEG	3	37,5	PB Confirmado*
	NEG	NEG	5	62,5	
Total			8	100	
MB	POS	POS	30	75,0	MB confirmado*
	NEG	POS	3	7,5	MB confirmado*
	POS	NEG	2	5,0	
	NEG	NEG	5	12,5	
Total			40	100	

* = baseado na positividade da baciloscopia de esfregaço. PB=Paucibacilares, MB=Multibacilares.

TABELA 2: Concordância entre baciloscopia de esfregaço intradérmico (BEI) e teste ML-Flow

ML-Flow	Baciloscopia de Esfregaço Intradérmico (BEI) Positivo	Baciloscopia de Esfregaço Intradérmico (BEI) Negativo	Total
Positivo	30 (75%)	2 (5%)	32
Negativo	3 (7,5%)	5 (12,5%)	8
Total	33	7	40

O ML-Flow, outra maneira para detectar anti-corpos, é um teste rápido e de simples execução. Não necessita de equipamentos especiais ou de refrigeração e o resultado pode ser visto em 5 a 10 minutos¹⁵.

Bührer-Sékula et al.^{4,18} observou em 2003 uma sensibilidade de de 97,4% para multibacilares e 40% para paucibacilares, a especificidade do teste foi de 90,2%. A presença destes anticorpos é sugestiva de uma infecção MB corrente e pode então ser utilizada para discriminar pacientes PB de MB¹⁵, reconhecer potenciais MB entre os contatos e prever quais os indivíduos que podem estar apresentando recidiva da doença .

A sensibilidade e especificidade do ELISA e ML-Flow mostraram-se semelhantes, com concordância de 91% entre eles ^{4,13,18}. Assim como outros testes sorológicos, o ML-Flow não é diagnóstico, pois a maioria dos PB não desenvolve anticorpos detectáveis, mas pode ser usado como ferramenta para classificação em PB e MB após o diagnóstico inicial¹³.

Entre os PB, três (37,5%) pacientes apresentaram ML-Flow fracamente positivo, o que corrobora relatos na literatura que citam sensibilidade de 40% do teste nesses casos.¹⁵

Pode-se explicar este fato pelo teste ser leitor-dependente e a diferença entre linha pálida e 1+ não ser tão significativa, apesar de mostrar-se na literatura uma concordância na reprodutibilidade da leitura do exame de 96% ¹³.

Nesta série, o teste ML-Flow foi positivo em 32 pacientes MB (80%) (Tabela 1).

Houve concordância de 87,5% entre a positividade da IBE e a positividade do ML-Flow Kappa=0,59, p<0,001. (Tabela 2)

Em 2 pacientes MB (5%), a IBE foi negativa e o ML-Flow foi positivo. Este fato pode ser devido a falhas na metodologia de coleta de material de baciloscopia, por exemplo.

Um destes pacientes tinha clínica de reabsorção de falanges bilateral e atrofia interóssea à esquerda, apresentou um valor de teste de Mitsuda de 3,5 mm e um IBB de 4+. Sua sorologia pelo ML-Flow foi de 3+. Evoluiu sem reações no período de 5 anos.

O segundo paciente apresentava mais de 5 placas e espessamento ulnar em sua clínica inicial, teste de Mitsuda de 5 mm, IBB de 1+, sorologia de ML-

Flow de 3+. Evolução também sem reações.

Em três MB (7,5%), a IBE foi positiva e o ML-Flow negativo.

Esses pacientes mostraram-se verdadeiramente multibacilares em sua investigação, portanto a sorologia (ML-Flow) falhou na detecção destes pacientes.

O primeiro apresentava uma placa única como clínica inicial, IBB de 2+, teste de Mitsuda de 7 mm, BEI de 2+. Evoluiu com reação reversa.

O segundo paciente tinha mais de 5 lesões e reação reversa inicialmente, IBB de 2+, teste de Mitsuda de 11 mm, BEI de 3+.

Já o terceiro destes pacientes tinha clínica de uma mácula inicialmente, espessamento ulnar bilateral. Seu IBB era de 2+, teste de Mitsuda de 5 mm, BEI de 1+. Evoluiu também com reação reversa.

Além disso, em 5 pacientes MB (12,5%), a baciloscopia e o ML-Flow foram negativos (Tabela 1). Possíveis explicações para este fato poderiam ser devidas a flutuações da imunidade ou mesmo pela presença de bacilos em local protegido do sistema imune (ramos nervosos) no momento da realização do exame laboratorial.

Observa-se que o ML-Flow poderia ser usado como alternativa à baciloscopia por sua praticidade, principalmente em crianças e em áreas onde não há profissionais adequadamente treinados em reconhecer a hanseníase e em fazer a coleta adequada de baciloscopia. Apresenta, todavia, suas limitações, como qualquer teste diagnóstico.

Também pode ser utilizado como critério diferencial, já que o teste mostrou alta sensibilidade no diagnóstico dos casos verdadeiramente MB (80%) em nossa série e, portanto, pode ser uma ferramenta útil em campo para auxiliar na correta escolha do tratamento dos pacientes com hanseníase. Porém, em centros de saúde especializados com profissionais treinados na detecção e classificação clínica de pacientes, o ganho na sensibilidade deste exame provavelmente será menos significativo.

CONCLUSÃO

Baciloscopia, teste de Mitsuda e histologia são exames auxiliares no diagnóstico, mas nenhum teste laboratorial, isoladamente, é 100% sensível e específico para a correta classificação clínica em todas as formas de hanseníase.

O ML-Flow é um teste rápido, de fácil manuseio em campo, é menos invasivo que a baciloscopia e apresenta boa concordância com esta última, podendo ser útil para auxiliar na decisão terapêutica em locais de difícil acesso a serviços de referência. □

AGRADECIMENTOS

Dr. Samira Bühler-Sékula
Dr. Cleverton Teixeira Soares

REFERÊNCIAS

- Parkash O, Kumar A, Pandey R, Nigam A, Girdhar BK. Performance of a lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. *J Med Microbiol.* 2008;57:130-2.
- Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological Surveillance of Household Contacts. *Clin Vaccine Immunol* 2008;15:101-5.
- Secretaria de Políticas de Saúde Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
- Oskam L, Slim E, Bühler-Sékula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev.* 2003;74:196-205.
- Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Lepr.* 1966;34:255-73.
- Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia.* 3ª Ed. rev. e amp. São Paulo: Artes médicas; 2007. p.625-51.
- Dharmendra. Classifications of leprosy. In: *Leprosy.* Hastings RC. 2nd edition, London: Churchill Livingstone; 1994. p.17990.
- WHO Expert Committee on Leprosy: Sixth report. Geneva: World Health Organization, 1998. Tech. Rep. Ser. 768.
- WHO Expert Committee on leprosy. Seventh report. Geneva: World Health Organization, 1998. Tech. Rep. Ser. 874, 143.
- WHO Study Group. Chemotherapy of leprosy. Geneva: World Health Organization, 1994. Tech Rep. Ser. 847.
- Buhrer-Sekula S, Sarno EN, Oskam L, Koop S, Wichers I, Nery JA, et al. Use of ML Dipstick as a Tool to Classify Leprosy Patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2000;68: 456-63.
- Barreto JA, Carvalho CV, Cury Filho M, Garbino JA, Nogueira MAS, Soares CT. Hanseníase multibacilar com baciloscopia dos esfregaços negativa: a importância de se avaliar todos os critérios antes de se definir a forma clínica. *Hansen Int.* 2007;32:75-9.
- Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1991-5.
- Opromolla DVA. Terapêutica. In: *Opromolla DVA. Noções de Hansenologia, Bauru: Centro de estudos Dr. Reynaldo Quagliato; 2000. p. 959.*
- Bührer-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MA, Dhakal KP, Namadi AU, Klatser PR, et al. The ML flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. *Lepr Rev.* 2007;78:70-9.
- Gallo MEN, Albuquerque ECA, Nery JAC, Sales AM. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. *An Bras Dermatol,* 2003;78:415-24.
- Crippa ILF, Schettini MCA, Schettini APM, Pennini SN, Rebelo PFB. Correlação clínico-laboratorial baseada em dados secundários dos casos de hanseníase atendidos no período de 01/2000 a 03/2001 na Fundação Alfredo da Matta, Manaus-AM, Brasil. *An Bras Dermatol.* 2004;79:547-54.
- Bührer-Sekula S, Cunha MG, Ferreira WA, Klatser PR The use of whole blood in a dipstick assay for detection of antibodies to *Mycobacterium leprae*: a field evaluation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;74:197-201.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Leticia Arsie Contin - Secretaria da residência médica

*Rodovia Comte. João Ribeiro de Barros, Km 225/226
17034-971 - Bauru - SP, Brasil*

E-mail: lecontin@hotmail.com

Como citar este artigo/How to cite this article: Contin LA, Alves CJM, Fogagnolo L, Nassif PW, Barreto JA, Lauris JRP, Nogueira ME. Uso do teste ML-Flow como auxiliar na classificação e tratamento da hanseníase. *An Bras Dermatol.* 2011;86(1):91-5.