

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

RAQUEL RODRIGUES BARBIERI

DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE PAUCIBACILAR
COM LESÃO ÚNICA

Rio de Janeiro

2013

DISSERTAÇÃO - MPCDI – IPEC R. R. BARBIERI 2013

DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE PAUCIBACILAR COM LESÃO ÚNICA

RAQUEL RODRIGUES BARBIERI

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre.

Orientadores: Dr. Fernando Augusto Bozza e
Dra. Alice de Miranda Machado

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

B236 Barbieri, Raquel Rodrigues

Diagnóstico da hanseníase paucibacilar com lesão única / Raquel Rodrigues Barbieri. – Rio de Janeiro, 2013.
x,59 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2013.

Bibliografia: f. 49-53

1. Hanseníase. 2. Diagnóstico. 3. PCR. 4. Tratamento. I. Título.

CDD 616.998

Raquel Rodrigues Barbieri

Diagnóstico da Hanseníase Paucibacilar com Lesão Única

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em 2013.

Orientadores: Dr. Fernando Augusto Bozza

Dra. Alice de Miranda Machado

Aprovada em ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Mayra Carrijo Rochael

Universidade Federal Fluminense – UFF

Dra. Maria Clara Gutierrez Galhardo

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ

Dr. Adalberto Rezende Santos

Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Fernando Augusto Bozza, por ter me apresentado ao prazer de fazer pesquisa.

À minha orientadora, Dra. Alice de Miranda Machado, pela paciência, pelos conhecimentos partilhados em hanseníase e histopatologia e pelo incentivo constante.

À Dra Euzenir Sarno pelo acolhimento e confiança em mim depositada.

À Dra. Anna Maria Sales pela contribuição em todas as etapas deste trabalho. Você foi fundamental! Muito obrigada!

Ao Dr José Augusto da Costa Nery pela dedicação aos pacientes e alunos e pelo incessante trabalho no ambulatório. Sua generosidade possibilitou a realização desta pesquisa.

A Nádia pelos sábios conselhos.

Ao Emanuel, fisioterapeuta, a Rita, assistente social, a Cíntia, secretária, e à todos os funcionários do Ambulatório Souza Araújo.

Ao Dr. Milton Osório Moraes pela disponibilidade para dividir os seus conhecimentos e experiência.

A Suelen, pela dedicação na realização de todos os PCRs deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Antunes, pela troca de idéias que muitas vezes clareou o caminho.

Ao Dr Bernard Kac pela participação na análise histopatológica.

A Mariana Hacker pelas análises estatísticas.

Ao Augusto e Daniel, sempre solícitos, e à todos os funcionários do Laboratório de Hanseníase.

À Pós Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

À Priscilla, secretária da vice Direção de Ensino e à todos os funcionários da secretaria.

Aos meus colegas de mestrado, em especial à Roberta Lemos e à Luana Côrrea, que além da ótima companhia, sempre ofereceram apoio.

Aos meus queridos tios e tias mineiros que muito contribuíram para que eu chegasse até aqui.

À minha mãe, Maria de Lourdes, pela dedicação incondicional de sempre e ao meu pai, José Geraldo (*in memorian*), por me ensinar que podemos escolher como viver.

Ao meu marido, Fábio, pela participação na realização deste trabalho. Sem você, não teria sido possível.

Para meus filhos,
Catarina e Antônio

Barbieri, R. R. **Diagnóstico de Hanseníase com Lesões Únicas em Placa**, Rio de Janeiro, 2013. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

RESUMO

Introdução: Apesar do recente declínio dos coeficientes de detecção de casos novos, a hanseníase permanece endêmica no Brasil e em outros países do mundo. O diagnóstico da doença se baseia nos aspectos clínicos, embora o índice baciloscópico e a histopatologia sejam usados como suporte para o diagnóstico. Nas formas paucibacilares, bacilos são raramente detectados e o exame histopatológico pode ser inconclusivo. Neste estudo, analisamos os aspectos clínicos e histopatológicos de pacientes com suspeita de hanseníase paucibacilar e estabelecemos a contribuição do PCR no manejo clínico destes casos.

Pacientes e Métodos: Foram estudados 66 pacientes com lesão cutânea única em placa, atendidos no Ambulatório Souza Araújo (ASA) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, no período de janeiro de 2008 a dezembro de 2011. Dois patologistas independentes, que não tinham informações sobre a história clínica dos pacientes, realizaram a reanálise histopatológica. Os pacientes foram classificados como Alta (A), Média (M) e Baixa (B) probabilidade do diagnóstico de hanseníase ou outras dermatoses (O). O DNA foi extraído de fragmentos de biópsias de pele e os níveis de *M. leprae* Ag85B e 16S rDNA foram estimados usando a amplificação por PCR quantitativo (qPCR). **Resultados:** O qPCR foi positivo em 46/66 (69.7%) das amostras de pele. Dos 66 pacientes, 57 (86.3%) tinham recebido tratamento com poliquimioterapia (PQT) baseado nos aspectos clínicos e histopatológicos. A associação entre o resultado do PCR e a variável tratamento mostrou que entre os 19 pacientes classificados como L+O, 2 pacientes com PCR positivo não tinham recebido tratamento e 6 pacientes com PCR negativo tinham sido tratados com PQT por 6 meses. **Conclusão:** Concluimos que o qPCR é uma ferramenta útil para o diagnóstico e o manejo clínico dos pacientes com suspeita de hanseníase paucibacilar, nos casos em que a histopatologia não é conclusiva.

Palavras Chave: hanseníase, diagnóstico, PCR, tratamento

Barbieri, R. R. **Diagnóstico de Hanseníase com Lesões Únicas em Placa**, Rio de Janeiro, 2013. Dissertation [Masters on Clinical Research in Infectious Diseases] Evandro Chagas - Clinical Research Institute.

ABSTRACT

Background: Despite recent decline in detection rates, leprosy remains endemic in Brazil and in others countries around the world. Frequently, the disease diagnosis is based only on clinical aspects, although the bacteriological index in skin smears and histopathological examination are used to support conclusions. In paucibacillary forms, bacilli are rarely detected, and histopathological examination may not be conclusive. In this study, we analysed the clinics and histopathological aspects of patients suspected of paucibacillary leprosy and try to establish the contribution of PCR to the clinical management of these cases. **Methods:** We evaluated 66 patients with single-plaque skin lesions who attended the Leprosy Outpatient Unit of Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, between 2008 and 2011. Two independent pathologists who were blinded to the patients' clinical details performed pathological reanalysis of slides. Patients were classified as High (H), Medium (M), and Low probability (L) for the diagnosis of leprosy or another dermatosis (O). DNA was extracted from the fragments of skin biopsies, and the levels of *M. leprae* Ag85B and 16S rDNA were estimated using qPCR amplification. **Findings:** The qPCR was positive in 46/66 (69.7%) of skin samples. Out of 66 patients, 57 (86.3%) received multidrug therapy (MDT) based on clinical and histopathological examination. The association between previous treatment and qPCR results showed that among 19 patients classified as L+O, 2 qPCR-positive patients were not treated, whereas 6 patients with negative qPCR results were treated with MDT for 6 months. **Conclusion:** In conclusion, qPCR is a useful tool to diagnosis and clinical management in suspected cases of paucibacillary leprosy in cases with inconclusive histopathology.

Keywords: leprosy, diagnosis, qPCR, Multidrug Therapy

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Anti- PGL 1 | Anticorpo anti-glicolípido fenólico-1 |
| BAAR | Bacilo álcool-ácido resistente |
| BB | <i>Borderline borderline</i> |
| BCG | Bacilo de Calmette-Guérin |
| BL | <i>Borderline</i> lepromatosa |
| BT | <i>Borderline</i> tuberculosa |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| HI | Hanseníase indeterminada |
| IB | Índice baciloscópico |
| IL | Interleucina |
| INF- γ | Interferon gama |
| LL | Hanseníase lepromatosa |
| MB | Multibacilar |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PB | Paucibacilar |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase) |
| PQT | Poliquimioterapia |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| TGF- beta | Transforming growth factor- beta (fator de transformação e crescimento beta) |
| TH1 | Linfócitos T helper tipo 1 |
| TH2 | Linfócitos T helper tipo 2 |
| TT | Hanseníase tuberculóide |

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Ciclo provável de transmissão do <i>M. Leprae</i> e espectro de formas clínicas da hanseníase..... | 6 |
| Figura 2: Alterações dos filetes nervosos na hanseníase A) Granuloma epitelióide infiltrando e destruindo o filete nervoso; B) Filete nervoso com laminação do perineuro..... | 13 |
| Figura 3: Aspectos clínicos e histopatológicos do diagnóstico diferencial na hanseníase. A)Granuloma Anular.(GA)-placa eritematosa com bordas papulosas e lesão adjacente; B) Histologia do GA: Paliçada de histiócitos e células multinucleadas circundando grande foco de necrobiose. HE 10X; C) Hanseníase borderline tuberculóide (BT)-placa eritemato-papulosa com lesão satélite; D) Histologia de BT: Filete nervoso profundo invadido pelo infiltrado granulomatoso com perineuro espessado. HE 10X; E) Sarcoidose-placa eritemato-acastanhado; F) Histologia da sarcoidose: Granulomas epitelióides não coalescentes sem halo linfocitário. HE 20X; G) Hanseníase BT-placa eritematosa com bordas bem definidos; H) Histologia de BT: Granulomas epitelióides com halo linfocitário e nervos não identificados. HE 10X..... | 15 |
| Quadro 1: Escala logarítmica de Ridley. Fonte Brasil. Baciloscopia em hanseníase. Guia de procedimentos técnicos 2010..... | 11 |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|-------------------------------------------|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 | ETIOPATOGENIA DA HANSENÍASE | 3 |
| 1.1.1 | Agente Etiológico | 3 |
| 1.1.2 | Transmissão e Evolução | 4 |
| 1.1.3 | Imunopatogenia | 5 |
| 1.2 | CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE | 5 |
| 1.3 | APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA HANSENÍASE | 7 |
| 1.4 | DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE | 9 |
| 1.4.1 | Clínico – Epidemiológico | 9 |
| 1.4.2 | Intradermorreação de Mitsuda | 10 |
| 1.4.3 | Diagnóstico baciloscópico | 11 |
| 1.4.4 | Diagnóstico sorológico | 12 |
| 1.4.5 | Diagnóstico histopatológico | 12 |
| 1.4.6 | Diagnóstico molecular | 17 |
| 1.5 | MANEJO CLÍNICO DA HANSENÍASE PAUCIBACILAR | 18 |
| 2 | OBJETIVOS | 20 |
| 3 | ARTIGO | 21 |
| 4 | CONCLUSÕES | 47 |
| | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |
| | ANEXO A – FICHA CLÍNICA | 53 |
| | ANEXO B – FICHA DA HISTOPATOLOGIA | 54 |
| | ANEXO C – PARECER DO CEP | 55 |
| | ANEXO D – TCLE | 57 |

1 INTRODUÇÃO

A Hanseníase é uma doença infecciosa e seu agente etiológico é o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). É uma enfermidade crônica que acomete principalmente a pele e os nervos periféricos e acredita-se que sua principal via de transmissão seja as vias aéreas superiores. O tempo de incubação varia de dois a cinco anos e a transmissão ocorre pelo convívio com doentes multibacilares antes do tratamento (Talhari *et al*, 2006).

Diante da possibilidade de tratamento da hanseníase pelo emprego da poliquimioterapia (PQT), em 1991 a OMS (Organização Mundial de Saúde) aprovou uma resolução para eliminar até o ano 2000 a doença como problema da saúde pública. Estabeleceu-se como meta a redução do coeficiente de prevalência para menos de 1 caso por 10.000 habitantes (WHO, 1991). Até o começo de 1999, dos 122 países que em 1985 foram considerados endêmicos, 94 alcançaram a meta de eliminação e a prevalência da hanseníase no mundo foi reduzida em 85% naquele período (WHO, 2002). Nos últimos anos, o controle da hanseníase tem aumentado devido às campanhas nacionais implementadas nos países endêmicos. Apesar disso, o número de casos novos detectados no mundo, em 2011, foi de 219.075 (WHO, 2012).

O Brasil possui a segunda maior taxa de detecção de casos novos e, após duas décadas de implantação da PQT, este coeficiente tem apresentado tendência a estabilização entre nós. No momento, a situação epidemiológica da doença é heterogênea devido a variação da incidência nas várias regiões geográficas. Os patamares muito altos deste coeficiente nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste fazem com que a doença ainda seja considerada endêmica no país (Penna *et al*, 2009). Em 2011 foram registrados 33.955 novos casos de hanseníase no Brasil, com 20.710 casos de multibacilares e 13.245 de paucibacilares (WHO, 2012). A taxa de detecção de casos novos foi de 17,6 casos por 100.000 habitantes, considerada alta (Brasil, 2012).

Em 2009, a OMS lançou uma nova estratégia global para o controle da hanseníase de 2011 a 2015. O objetivo é a redução do número de casos novos diagnosticados com grau 2 de incapacidade, em pelo menos 35% até o final de 2015, comparado com os dados registrados no final de 2010 (WHO 2012). Com esta estratégia espera-se diminuir atrasos na detecção e tratamento de pacientes com hanseníase, assim como reduzir a transmissão da doença.

Esta meta reforça a importância do diagnóstico precoce e mais preciso da hanseníase. É crucial garantir que todos os pacientes com hanseníase recebam tratamento com PQT,

prevenindo incapacidades e interrompendo a cadeia de transmissão da doença. Por outro lado, é preciso evitar que não portadores da doença sejam expostos aos efeitos colaterais das medicações e ao estigma que ainda hoje acompanha este diagnóstico. O maior desafio recai sobre os casos em que os bacilos não podem ser identificados no raspado dérmico (paucibacilares - PB).

O Ministério da Saúde orienta que o diagnóstico de hanseníase seja definido quando um ou mais dos seguintes achados estiverem presentes: lesão de pele com alteração de sensibilidade e/ou espessamento de nervo e/ou bacilos visualizados no exame direto do raspado dérmico (Brasil, 2002). Nas regiões endêmicas, estes sinais e sintomas, somados à história epidemiológica, confirmam um caso novo.

Mas, lesões do tipo placa, frequentes na hanseníase, são também a apresentação clínica de muitas outras doenças dermatológicas como pseudolinfoma, esclerodermia, granuloma anular, eritema anular centrífugo, sarcoidose, tuberculose cutânea, leishmaniose, micoses profundas e outras. A diminuição da sensibilidade nestas lesões cutâneas colabora para o diagnóstico diferencial, mas lesões de hanseníase podem ter sensibilidade ainda inalterada (Ustianowski e Lockwood, 2003; Walker e Lockwood, 2006) e placas muito infiltradas de qualquer etiologia podem apresentar sensibilidade diminuída. Nervos periféricos espessados podem estar ausentes nos estágios iniciais da doença e BAAR raramente são visualizados nas formas tuberculóide (TT) e *borderline* tuberculóide (BT).

Diante de um caso suspeito com aspecto clínico similar a outras dermatoses e baciloscopia negativa, a histopatologia tem sido uma ferramenta fundamental para o diagnóstico. Os parâmetros histopatológicos são bem definidos e são um reflexo da resposta imune do hospedeiro (Ridley e Jopling, 1966). Ainda assim, muitos estudos demonstram que o caráter interpretativo, inerente ao exame histopatológico, pode levar à discordâncias entre patologistas no diagnóstico das diferentes apresentações da hanseníase (Fine, 1986 *et al*; Fine *et al*, 1993, Lockwood *et al*, 2012). Nas formas TT e BT, a baixa carga bacilar dificulta a identificação dos bacilos no tecido e, assim, a conclusão do exame histopatológico depende da experiência e interpretação do patologista. Diante de um laudo histopatológico inconclusivo, a difícil decisão entre iniciar o tratamento com PQT ou manter o paciente sob observação é do dermatologista.

Nos últimos anos, após a identificação do genoma do *M. leprae* (Cole *et al*, 2001) a reação em cadeia da polimerase (PCR) trouxe uma expectativa de maior precisão para o diagnóstico da hanseníase. Apesar de muitas pesquisas desenvolvidas no sentido de avaliar a utilidade da PCR na prática clínica (Job *et al*, 1996; Santos *et al*, 1997; Souza *et al*, 2007), o

seu papel ainda não está bem estabelecido.

1.1 ETIOPATOGENIA DA HANSENÍASE

1.1.1 Agente etiológico

O *M. leprae*, agente etiológico da hanseníase, é membro da família *Mycobacteriaceae* ordem *Actinomycetales*, classe *Schizomycetes*. Em 1873 Armauer Hansen (1941-1912), na Noruega, demonstra que a doença é causada por esta micobactéria e por isso é também denominado Bacilo de Hansen. É um bastonete reto ou levemente encurvado, com 1 a 8 micra de comprimento, Gram positivo e ácido álcool resistente. Ainda não se conseguiu cultivar o bacilo em meios de cultura, o que colabora para a dificuldade diagnóstica, mas consegue-se sua multiplicação pelas técnicas de inoculação no coxim plantar de camundongos (Shepard, 1962). Utilizando-se a técnica de Shepard foi possível estabelecer que o tempo de multiplicação dos bacilos é de 13 a 14 dias, que permanecem viáveis fora do organismo humano por 36 horas à temperatura ambiente, e por cerca de 7 a 9 dias à temperatura de 36,7° C com 77,6% de umidade média. À microscopia eletrônica verifica-se que o envoltório celular é composto pela membrana plasmática, parede celular e uma camada mais externa rica em lipídios. O lipídio dominante, que confere especificidade imunológica ao *M. leprae*, é o glicolipídio fenólico 1 (PGL- 1). Este trissacarídeo ao se unir à cadeia alfa 2 da lâmina basal da célula de Schwann, permite a entrada do bacilo no sistema nervoso periférico (Rambukkana *et al*, 1997). A predileção do bacilo pela célula neural traz vantagens significativas para sua sobrevivência. As células de Schwann não têm capacidade fagocítica e, portanto, são incapazes de destruir patógenos. Além disso, a barreira sanguínea do nervo limita o acesso de vários medicamentos à célula de Schwann. A longa permanência de *M. leprae* nestas células permite a contínua liberação de bacilos na circulação colaborando para a manutenção da infecção e recidiva da doença (Sampaio e Rivitti, 2007).

O sequenciamento genético do *M. leprae*, obtido em 2001, evidenciou uma perda considerável de genes funcionais em comparação com outras micobactérias. Menos de 50% do genoma do *M. leprae* codifica sequência proteica, enquanto que no *Mycobacterium tuberculosis* 90% do genoma é codificante (Cole *et al*, 2001). As mutações que levaram à perda de função de parte do genoma (Vissa e Brennan, 2001) podem ser resultado de uma adaptação do bacilo ao ambiente em que vive. Este patógeno vive em ambientes estáveis,

ricos em substrato e, portanto, necessita de pouca versatilidade metabólica para sobreviver. Uma hipótese mais recente sugere que este acúmulo de pseudogenes no *M. leprae* tenha limitado a sua capacidade de sobreviver em condições com amplas variações ambientais (Williams *et al*, 2007) e isto contribuiu para a evolução adaptativa do bacilo a nichos especializados, dentro de macrófagos e células de Schwann dos nervos periféricos em humanos.

1.1.2 Transmissão e evolução

O modo de transmissão da hanseníase não é bem conhecido, embora provavelmente ocorra por via respiratória e/ou cutânea (Hatta *et al*, 1995). O *M. leprae* é eliminado pelas secreções nasais da orofaringe (Pedley *et al*, 1978) e soluções de continuidade da pele de doentes bacilíferos, antes do início do tratamento (Job *et al*, 2008). Indivíduos que mantêm contato com estes pacientes têm maior chance de desenvolver a doença. Os fatores associados ao maior risco de infecção entre os contatos são alta carga bacilar do caso índice, contato intradomiciliar e consanguinidade (Fine *et al*, 1997; Sales *et al*, 2011). Por outro lado, a vacinação com BCG (*Bacillus de Calmete-Guérin*) está relacionada à proteção (Zodpey *et al*, 2005).

Seres humanos são o principal reservatório da infecção, embora, nas Américas, tatus também tenham sido considerados reservatório (Walsh *et al*, 1981; Truman *et al*, 2011). O bacilo tem alta infectividade e baixa patogenicidade e virulência. Assim, muitos indivíduos se infectam em áreas endêmicas mas poucos desenvolvem a doença. A evolução da infecção é lenta e o período de incubação da hanseníase é de 2 a 5 anos.

Nos indivíduos infectados, de acordo com o padrão de resposta imune desenvolvido pelo hospedeiro, a infecção pode ser abortada, pode evoluir para manifestação subclínica, que regride espontaneamente, ou pode evoluir para hanseníase indeterminada (HI). A hanseníase indeterminada também pode regredir espontaneamente ou evoluir para uma das formas polares. Em um dos polos está a hanseníase tuberculóide (TT) caracterizada pela efetiva resposta imune celular e, portanto, pequeno número de bacilos (paucibacilar) e, no outro extremo, a hanseníase lepromatosa (LL) em que a baixa resistência do hospedeiro permite a livre multiplicação dos bacilos nos macrófagos (multibacilar). Quando o grau de resistência imune celular for intermediário, entre a forma tuberculóide e lepromatosa, há evolução para o

grupo borderline ou dimorfo (Ridley e Jopling, 1966, Britton e Lockwood, 2004).

1.1.3 Imunopatogenia

A grande maioria das pessoas não desenvolve hanseníase após a exposição ao *M. leprae* (Pedley *et al*, 1978, Noordeen, 1994). Somente 10% das pessoas infectadas apresentarão sintomas da doença (Lockwood e Suneetha, 2005). A progressão e a definição das formas clínicas da hanseníase dependem fundamentalmente do tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro, através da interação entre as subpopulações de células TH1 e TH2 (Ramos *et al*, 1989).

No pólo tuberculóide, os pacientes apresentam eficiente resposta imune celular contra o *M. leprae*, através da ativação de linfócitos do tipo TH1. Há produção intensa de citocinas pró-inflamatórias, IFN-gama, interleucina 2 (IL-2) e IL-12, responsáveis pela ativação de macrófagos (Spellberg e Edwards, 2001). Esta resposta imune mediada por células leva à formação de granulomas bem organizados, que promovem a efetiva destruição dos bacilos. No interior dos granulomas há predomínio de linfócitos T CD4+ e na periferia se encontram as células T CD8+ (Modlin *et al*, 1983) numa proporção de 2:1 (Modlin e Rea, 1987).

Em contraposição, no outro pólo da doença, na hanseníase lepromatosa (LL), há ativação de linfócitos do tipo TH2, que produzem predominantemente IL-4 e IL-10 (Yamamura *et al*, 1992) consideradas desativadoras de macrófagos. O fator de crescimento e transformação-beta (TGF-beta), citocina supressora da atividade macrofágica, também é encontrado em quantidades elevadas nas lesões dos pacientes LL (Godal *et al*, 1984). A resposta imune do tipo TH2 não induz à formação de granulomas e não controla a proliferação dos bacilos. Nestes casos, a carga bacilar é alta e há elevada produção de anticorpos contra o glicolípido fenólico específico da parede do *M. leprae* (anti-PGL1) (Cho SN *et al*, 2001). Nas formas intermediárias da hanseníase, borderline tuberculóide (BT), borderline borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL), há diminuição progressiva da resposta imune celular da forma BT para BL.

1.2 CLASSIFICAÇÃO DA HANSENÍASE

Da interação entre o *M. leprae* e o ser humano, observamos diferentes manifestações clínicas da hanseníase que são decorrentes das diversas respostas imunológicas do hospedeiro. Deste modo, numerosas classificações surgiram no decorrer da história da doença. A seguir, mencionamos as mais frequentemente utilizadas.

No VI Congresso Internacional de Leprologia, realizado em Madri em 1953, estabeleceu-se a classificação polar da hanseníase. Considerou-se as duas formas polares tuberculóide e Virchowiana, que são estáveis e os grupos indeterminado e dimorfo considerados instáveis (Madri, 1953). Nesta classificação, a hanseníase indeterminada (HI) é considerada a forma inicial da doença, podendo regredir espontaneamente ou evoluir para uma das outras formas. Esta é a classificação usada pelo programa de controle da hanseníase no Brasil.

Ridley e Jopling em 1962 e 1966 publicaram dois trabalhos em que propõem uma classificação que amplia a classificação de Madri. Dividiram o grupo dimorfo, denominado *borderline*, em *borderline* tuberculóide (BT), *borderline borderline* (BB) e *borderline* lepromatoso (BL) e admitiram a instabilidade deste grupo. Deste modo, os pacientes classificados como BB e BL podem caminhar no espectro em direção a um dos pólos enquanto os pacientes BT são mais estáveis. Os autores sugeriram também que os pacientes situados no pólo lepromatoso podem, durante o tratamento, desenvolver surtos reacionais que os aproximam do grupo *borderline*. Esta classificação se baseia na resposta imune do hospedeiro e nos aspectos histopatológicos das lesões (Ridley e Jopling, 1962 e 1966). Atualmente é a classificação mais usada em estudos clínicos.

Assumindo que a proteção oferecida pela resposta imune celular é inversamente correlacionada ao número de lesões, as formas multibacilares têm mais lesões do que os paucibacilares. Apoiada nesta informação a OMS determinou que pacientes com 1 a 5 lesões podem ser classificados como PB e com mais de 5 lesões como MB (WHO, 1998). A baciloscopia, quando possível, deve ser utilizada para auxiliar nesta classificação. A baciloscopia positiva classifica o paciente como MB independentemente do número de lesões (WHO, 2000).

Esta classificação Operacional da OMS é amplamente usada para definir o esquema terapêutico a que o paciente será submetido, quando não é possível a realização da baciloscopia. Cavalcanti e col. (2012) avaliaram a concordância entre a classificação

operacional e o resultado da baciloscopia e observaram que entre os pacientes com BI negativo, 23% tinham mais de 5 lesões e entre os BI positivos 11% tinham menos de 5 lesões (Cavalcanti *et al*, 2012). Na Índia, estudo comparando a classificação de Ridley e Jopling e a Operacional OMS mostrou que 60% dos casos classificados como BT tinham sido tratados como MB e a baciloscopia era negativa (Van Brakel *et al*, 2005). Quanto mais precisa for a classificação menor é o risco do surgimento de cepas resistentes do *M.leprae* e de possíveis recidivas.

1.3 APRESENTAÇÕES CLÍNICAS DA HANSENÍASE

Os variados padrões de resposta imune que o hospedeiro pode desenvolver contra o *M. leprae* levam a uma grande variedade de apresentações clínicas da doença.

Na classificação espectral proposta por Ridley e Jopling (1966), em um dos extremos estão os pacientes com hanseníase tuberculóide (TT). Estes indivíduos desenvolvem uma boa resposta imune celular contra o *M. leprae* e, clinicamente apresentam lesões do tipo placa, que são lesões cutâneas elevadas e com o diâmetro maior do que sua altura em relação à superfície da pele (Fitzpatrick, 1999). As lesões dos pacientes TT são bem delimitadas, eritematosas ou acastanhadas, com contornos regulares ou irregulares, de aspecto anular, circinado ou geográfico que podem se tornar infiltradas. Podem ser únicas ou em pequeno número e sua distribuição é assimétrica. Frequentemente há alteração de sensibilidade térmica dolorosa ou tátil nestas lesões. Troncos nervosos periféricos podem se tornar espessados e o paciente pode referir dor à palpação destes nervos. Deformidades incapacitantes podem ser observadas nos casos em que as formas tuberculóides da hanseníase evoluem com neurite.

No centro do espectro, encontram-se as formas *borderline*, que são instáveis e tendem ora para o pólo tuberculóide, com maior resistência ao bacilo, ora para o lepromatoso, de maior suscetibilidade. Nos pacientes *borderline-tuberculóide* (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline-lepromatoso* (BL), a decrescente resposta mediada por células da forma BT para BL é acompanhada por maior número de lesões de pele e nervos, aumento da carga bacilar e dos níveis de anticorpos. A hanseníase na forma BT se assemelha clinicamente à hanseníase TT, porém, em geral, as lesões são mais numerosas, podem ser extensas e pode haver lesões satélite. As lesões neurais podem ser graves e em geral com acometimento assimétrico.

No outro extremo do espectro, estão os pacientes com a forma lepromatosa (LL), que não apresentam resposta imune celular efetiva contra o bacilo, o que se exterioriza clinicamente por lesões cutâneas numerosas e disseminadas, madarose, infiltração difusa da face e do pavilhão auricular. Há alteração de sensibilidade nas extremidades que podem apresentar feridas traumáticas e atrofias musculares.

Quando a doença não pode ser classificada dentro deste espectro, pois a resposta imune do hospedeiro ainda não está definida, denominamos hanseníase indeterminada (HI). As lesões clínicas características são máculas hipocrômicas, únicas ou múltiplas, com alteração de sensibilidade. A tendência destes casos é assumir características de uma das cinco formas clínicas descritas anteriormente.

Na forma clínica conhecida como Neural Pura a infecção acomete somente o(s) nervo(s) e frequentemente há alteração de sensibilidade na área da pele inervada pelas fibras nervosas inflamadas.

Durante o curso da doença podem surgir as reações hansenianas que são fenômenos inflamatórios agudos, localizados ou sistêmicos, que ocorrem antes, durante ou após o tratamento específico da doença. Determinadas condições como gravidez, infecções, stress físico e emocional e tratamento com PQT têm sido identificados como desencadeantes destas reações (Lienhardt e Fine, 1994). As reações estão relacionados com a carga bacilar e a resposta imune do hospedeiro e são classificadas em 2 tipos: reação tipo 1 (reação reversa) e reação tipo 2 (eritema nodoso lepromatoso). Os dois tipos de reações podem ser acompanhados de neurites que são causas de incapacidades físicas e deformidades irreversíveis.

A reação tipo 1 ocorre em pacientes com algum grau de imunidade celular, como aqueles com as formas tuberculóides e *borderlines*. Acontece pela liberação de antígenos decorrentes da destruição bacilar, antes ou durante o tratamento com PQT. As lesões pré existentes se tornam mais eritematosas, edematosas, e novas lesões com características semelhantes podem surgir. Pode haver comprometimento de nervos periféricos.

A reação tipo 2 ocorre nas formas lepromatosas ou *borderlines* e acredita-se que seja desencadeada por depósito de imunocomplexos (Wemambu *et al*, 1969). Pode surgir antes, durante ou após o tratamento. Os surtos podem se tornar subentrantes. Clinicamente surgem placas e nódulos subcutâneos eritematosos, dolorosos que podem ulcerar. Pode vir acompanhado de sintomas sistêmicos como febre, mal estar, neurites, artrites, irites, írido-ciclites, orquites, linfadenomegalias e hepato-esplenomegalias (Tolentino *et al*, 1965)

As várias apresentações clínicas da hanseníase exigem o diagnóstico diferencial com

grande número de dermatosis e neuropatias. Nas formas tuberculóide e *borderline* tuberculóide, quando a apresentação clínica é uma placa única, temos que considerar pseudolinfomas, eritema anular centrífugo, sífilis, esclerodermia em placa, dermatofitose, entre outras. Mas, considerando que lesões recentes de hanseníase podem não apresentar as alterações teciduais típicas, o exame histopatológico muitas vezes é inconclusivo. Entre as doenças que histologicamente apresentam infiltrado inflamatório granulomatoso, como granuloma anular, sarcoidose, tuberculose cutânea, leishmaniose e micoses profundas, o diagnóstico diferencial pode se tornar ainda mais difícil. Nestes casos, aspectos clínicos e histopatológicos semelhantes, não visualização do bacilo no raspado dérmico e no tecido e a impossibilidade de cultivo do *M. leprae* tornam o diagnóstico um desafio.

1.4. DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

Ainda hoje, não existe uma técnica que possa ser denominada de padrão-ouro para o diagnóstico da doença. Deste modo, em um centro de referência, a combinação das características epidemiológicas, clínicas, bacteriológicas somadas às histológicas e, recentemente, moleculares são utilizadas para a definição do diagnóstico.

1.4.1 Diagnóstico clínico - epidemiológico

Entre os dados epidemiológicos é importante saber se o paciente é ou foi morador de regiões com altas taxas de detecção e se tem ou teve contato com pessoas portadoras de hanseníase.

O exame dermatológico inclui a descrição das lesões cutâneas, considerando o tipo de lesão, a cor, a localização e sua dimensão e sensibilidade. Nervos periféricos devem ser palpados para identificar possíveis espessamentos e incapacidades físicas devem ser identificadas.

A alteração de sensibilidade térmica pelo frio pode ser avaliada com o uso de tubo de vidro contendo água fria e, pelo calor, com tubos de ensaio contendo água aquecida a 45 graus Celsius. Na impossibilidade de usar os tubos com água quente e fria, pode-se utilizar um chumaço de algodão embebido em éter. Para a avaliação da sensibilidade dolorosa são usados objetos pontiagudos e para a sensibilidade tátil, um chumaço de algodão seco. Estes objetos

são sucessivamente apoiados sobre a lesão e as sensações relatadas pelo paciente (quente/frio; sente/não sente) são consideradas pelo examinador para determinar a alteração da sensibilidade (Brasil, 2002).

Nos últimos anos, com o objetivo de uniformizar e graduar a alteração da sensibilidade tátil das lesões cutâneas e das mãos e pés, foi proposto o uso dos monofilamentos de Semmes-Weinstein. O resultado desta avaliação se baseia no peso dos monofilamentos, considerando a sensação do paciente quando cada um deles é apoiado sobre a pele. A sensibilidade tátil é considerada normal quando o paciente sente os monofilamentos com peso entre 0,05g e 0,2g, diminuída quando os sente entre 2g e 10g e abolida quando sente somente o monofilamento de 300g ou há ausência de percepção de qualquer monofilamento. O uso dos filamentos colabora para a avaliação do grau de incapacidade (Brasil, 2008).

Como acima descrito, os testes para a avaliação de alterações da sensibilidade são subjetivos pois dependem da técnica do examinador e da colaboração e bom entendimento do paciente (Shumin *et al*, 2006; Van Brakel *et al*, 1996). Além disso, placas muito infiltradas ou edemaciadas podem se mostrar com alteração de sensibilidade por compressão dos filetes nervosos sem que haja infecção pelo bacilo de Hansen. Neuropatias periféricas de qualquer etiologia também dificultam esta avaliação. Por outro lado, lesões cutâneas de hanseníase, podem ter sensibilidade normal (Ustianowski e Lockwood, 2003). Assim, as alterações de sensibilidade devem ser cuidadosamente interpretadas.

1.4.2 Intradermorreação de Mitsuda

O teste intradérmico consiste na inoculação de bacilos mortos pelo calor na face anterior do antebraço esquerdo. A leitura é realizada após 28 dias e é considerado reagente quando há formação de pápula. Esta é a reação de Mitsuda, e está diretamente relacionada à resposta imunológica do hospedeiro. Quanto maior a pápula maior a resistência do indivíduo ao bacilo. Em países endêmicos, indivíduos saudáveis que já foram expostos ao *M. leprae* podem ter reação de Mitsuda positiva e por isso este exame não é usado para diagnóstico da hanseníase, mas pode auxiliar na classificação das formas clínicas. Nas formas TT e BT espera-se um teste positivo > ou igual a 5mm. De BB a LL a pápula reacional tende a ser não mensurável. Na hanseníase indeterminada, o Mitsuda pode ser reagente ou não reagente

1.4.3 Diagnóstico baciloscópico

O exame baciloscópico de esfregaços cutâneos é o exame complementar mais frequentemente utilizado para o diagnóstico da hanseníase. Para este exame é realizada a coleta de material de raspado dérmico de quatro sítios: lobos auriculares, cotovelo direito e da lesão cutânea. Após coloração pela técnica de Ziehl-Neelsen, ao microscópio óptico, os bacilos podem ser visualizados isolados, agrupados ou em aglomerados compactos, chamados globias. Nestas globias os bacilos estão fortemente unidos por material gelatinoso (gléia) e dispostos paralelamente. É a única micobactéria que apresenta este tipo de disposição. O índice baciloscópico (IB) é determinado com base na escala proposta por Ridley e Jopling em 1962 (Ridley e Jopling, 1962). (Quadro 1)

| Índice Baciloscópico | Descrição da baciloscopia |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------|
| 0 | Ausência de bacilos em 100 campos examinados. |
| 1+ | Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados |
| 2+ | Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados |
| 3+ | Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado |
| 4+ | Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado |
| 5+ | Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado |
| 6+ | Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado |

Quadro 1: Escala Logarítmica de Ridley, Fonte: Brasil. Baciloscopia em Hanseníase. Guia de procedimentos técnicos, 2010.

O IB do paciente é calculado pela média aritmética dos IBs de cada sítio analisado. Os pacientes com baciloscopia negativa nas cinco amostras são classificados como paucibacilares (PB), e os multibacilares (MB) são aqueles em que bacilos foram identificados em pelo menos uma das amostras colhidas. Nas lesões cutâneas muito recentes e nas formas TT e BT a baciloscopia é frequentemente negativa. Isto se deve ao longo tempo de reprodução do *M. leprae* e uma resposta imune eficaz do hospedeiro.

Nas formas BB, BL e LL a baciloscopia é frequentemente positiva e na hanseníase indeterminada pode ser positiva ou negativa. A classificação em PB ou MB é o que define a conduta terapêutica.

1.4.4- Diagnóstico sorológico

A sorologia mais utilizada e melhor padronizada é a pesquisa de anticorpos IgM anti PGL-1 (Oskam *et al*, 2003), frequentemente é positiva entre os MB, mas tem baixa sensibilidade nos pacientes PB. Vários estudos têm mostrado que a positividade da sorologia anti PGL-1 reflete o índice baciloscópico do paciente e pode auxiliar na correta classificação clínica e na identificação de contatos com risco aumentado de desenvolver hanseníase (Buhrer-Sékula *et al*, 2003; Duppre *et al*, 2012).

1.4.5- Diagnóstico histopatológico da hanseníase

Na histopatologia, os achados microscópicos representam o padrão de resposta imune do hospedeiro. Podem variar de infiltrado inflamatório mononuclear em torno dos anexos cutâneos na hanseníase indeterminada, granulomas tuberculóides típicos do pólo tuberculóide ou infiltrado inflamatório composto por macrófagos repletos de bacilos característicos da forma lepromatosa. Em 1974, Ridley, definiu critérios para o diagnóstico microscópico de todas as formas da doença (Ridley, 1974).

1.4.5.1 Hanseníase Tuberculóide (TT)

Nas amostras de pele das formas TT espera-se encontrar focos de células epitelióides bem desenvolvidas, com ou sem células gigantes de Langhans, envolvidas por denso infiltrado de linfócitos caracterizando os granulomas epitelióides. Estes granulomas são vistos acompanhando vasos, anexos e nervos cutâneos dérmicos e podem atingir a epiderme. A análise das subpopulações de linfócitos, por imunohistoquímica, mostra que os linfócitos T CD4+ estão distribuídos por todo o granuloma, enquanto os linfócitos T CD8+ estão presentes somente na sua periferia (Modlin *et al*, 1983).

Nesta forma pode haver diminuição do número de filetes nervosos porque os filetes podem estar totalmente destruídos, não sendo possível identificá-los nos cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina; outras vezes os nervos dérmicos podem ser penetrados, dissociados ou fragmentados pela reação granulomatosa (Ridley e Jopling, 1966).

Estas características mostram que na hanseníase tuberculóide há boa resposta imune do hospedeiro, com efetiva ativação de macrófagos e consequente destruição do *M. leprae*.

Por isso, na coloração pelo método de Wade os bacilos são raramente visualizados.

1.4.5.2 Hanseníase *Borderline* tuberculóide (BT)

Na forma BT, além de todos os achados da forma TT, pode haver uma zona subepidérmica livre de células inflamatórias (faixa de Unna) e, eventualmente, bacilos podem ser visualizados (Ridley, 1974).

O diagnóstico histológico de hanseníase no pólo tuberculóide (TT e BT) só é conclusivo quando bacilos estão presentes nos cortes estudados ou há identificação de nervos invadidos pelo infiltrado inflamatório (Figura 1). Mas a interpretação histopatológica da agressão aos nervos pode ser um desafio até para experientes patologistas e esta é uma das limitações para o diagnóstico histopatológico das formas paucibacilares da hanseníase (Fleury e Bacchi, 1987; Gupta *et al*, 2006).

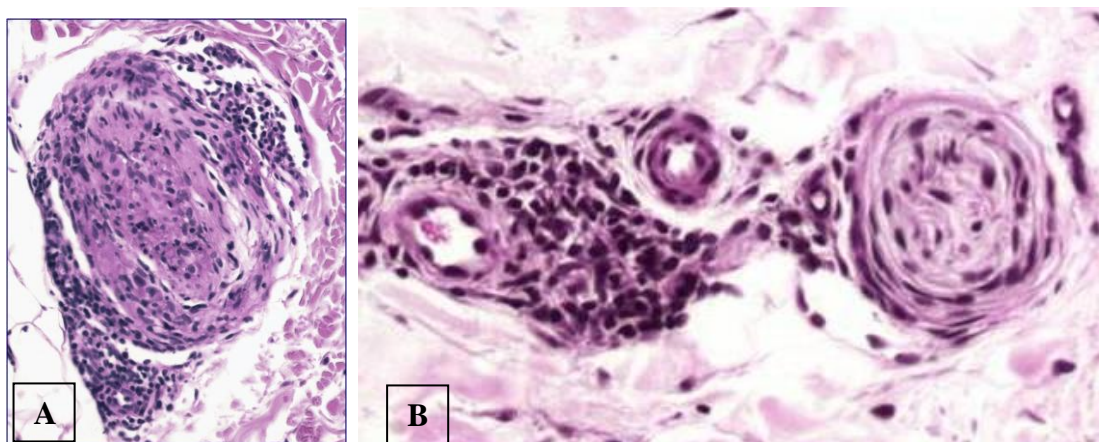


Figura 1: Alterações dos filetes nervosos na hanseníase A) Granuloma epitelióide infiltrando e destruindo o filete nervoso; B) Filete nervoso com laminação do perineuro.

Quando os achados histológicos clássicos não estão presentes ou são de difícil análise, o diagnóstico diferencial com outras dermatosis se faz necessário (Lever, 1991) e as mais frequentes são:

- Granuloma anular: que se caracteriza pela presença de histiócitos epitelióides em

paliçada contornando áreas de degeneração do colágeno (necrobiose) (Figura 2).

- Sarcoidose: que se caracteriza por granulomas epitelióides sem halo linfocitário (granuloma nu), que não envolvem os filetes nervosos (Figura 2).

- Rosácea: que se caracteriza pela presença de granulomas epitelióides, com poucas células gigantes de Langhans, envolvendo anexos, principalmente folículos pilosos. Os granulomas se acompanham de dilatação de óstios foliculares ou ruptura dos folículos, além da presença de filetes normais em meio ao infiltrado.

- Tuberculose cutânea: que apresenta granulomas com necrose caseosa central, sem agressão aos filetes nervosos.

- Leishmaniose tegumentar que se caracteriza por hiperplasia da epiderme e granulomas acompanhados por denso infiltrado inflamatório linfo-plasmo-histiocitário, também com filetes nervosos preservados.

- Micoses profundas: que se caracterizam por granulomas acompanhados de infiltrado inflamatório misto, com microabscessos ou granulomas abscedidos.

Os achados histológicos característicos de cada uma destas dermatosis podem não estar bem representados nos cortes examinados dificultando a conclusão diagnóstica. Fatores ligados às técnicas de coleta do material para exame, fixação das amostras, preparo e coloração dos cortes histológicos também interferem nesta conclusão.

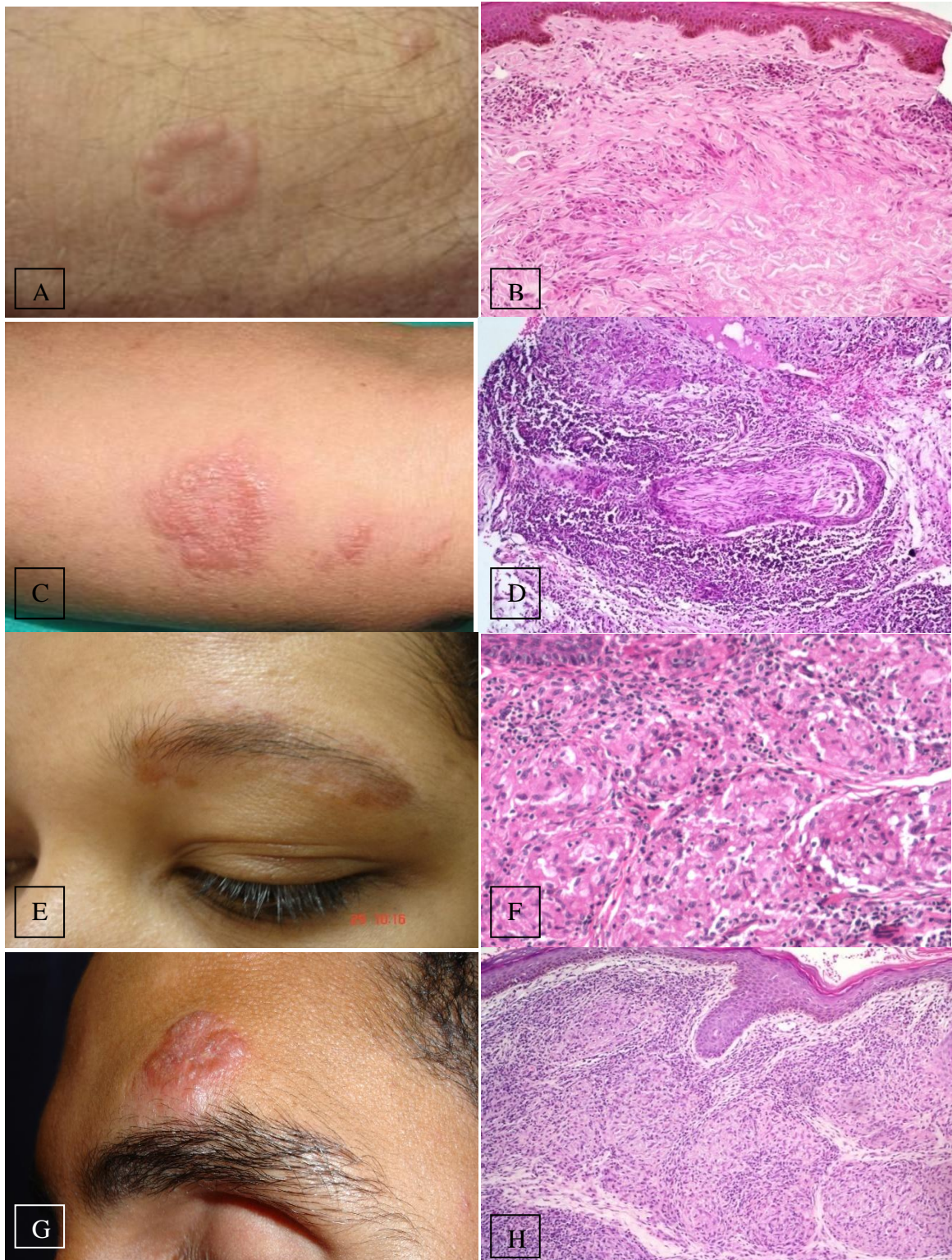


Figura 2: Aspectos clínicos e histopatológicos do diagnóstico diferencial na hanseníase. A) Granuloma Anular.(GA)-placa eritematosa com bordas papulosas e lesão adjacente; **B)** Histologia do GA: Paliçada de histiócitos e células multinucleadas circundando grande foco de necrobiose. HE 10X; **C)** Hanseníase borderline tuberculóide (BT)-placa eritemato-papulosa com lesão satélite; **D)** Histologia de BT: Filete nervoso profundo invadido pelo infiltrado granulomatoso com perineuro espessado. HE 10X; **E)** Sarcoidose-placa eritemato-acastanhada; **F)** Histologia da sarcoidose: Granulomas epitelióides não coalescentes sem halo linfocitário. HE 20X; **G)** Hanseníase BT-placa eritematosa com bordas bem definidas; **H)** Histologia de BT: Granulomas epitelióides com halo linfocitário e nervos não identificados. HE 10X;

1.4.5.3 Hanseníase *Borderline borderline* (BB) e *Borderline lepromatosa* (BL):

Na forma BB a zona subepidérmica é clara e há formação de granulomas frouxos, difusamente distribuídos e constituídos por células epitelióides de citoplasma claro, além de edema intersticial. Não há células gigantes multinucleadas e observa-se diminuição importante do número de linfócitos em relação às formas tuberculóides. Os filetes nervosos são facilmente visualizados e bacilos estão presentes sem que haja formação de globias. O IB varia de 3 a 4+.

Na hanseníase BL há maior número de linfócitos em relação a BB, embora a quantidade seja bastante variável, e os macrófagos formam esboços de granulomas, com presença da faixa de Unna. A maior parte dos macrófagos apresenta-se vacuolizada. Os filetes nervosos dérmicos são, geralmente, fáceis de identificar e podem ter aparência normal, estarem edemaciados ou mostrar aspecto em “casca de cebola”, com interposição de edema e células inflamatórias entre as fibras nervosas. O índice baciloscópico varia de 4 a 5+ (Ridley, 1974).

1.4.5.4 Hanseníase lepromatosa (LL):

Na forma LL a epiderme está atrófica, com cristas interpapilares retificadas e ausência de formação de granulomas epitelióides. A faixa de Unna é bem evidente e, no infiltrado inflamatório, há predomínio de macrófagos que se tornam vacuolizados e repletos de bacilos, podendo formar globias. Plasmócitos estão presentes e linfócitos são raros com predomínio de células T CD8+ (Van Voorhis *et al*, 1982). Os filetes nervosos geralmente estão preservados e são facilmente identificados. O índice baciloscópico varia de 5 a 6+. Estas características histopatológicas refletem a incapacidade do hospedeiro de montar uma resposta imune do tipo celular contra o bacilo de Hansen.

O diagnóstico diferencial histopatológico da LL se faz com xantomas e micobacterioses atípicas.

Nas três últimas formas citadas, mesmo sendo possível uma apresentação clínica atípica, com número reduzido de lesões, é praticamente impossível a ausência de bacilos nos esfregaços dérmicos e nas lesões. Portanto, nesses casos o diagnóstico histopatológico não causa problemas.

1.4.5.5 Hanseníase indeterminada (HI)

A hanseníase indeterminada corresponde à fase inicial da doença e vai evoluir de acordo com a resposta imune do hospedeiro. Lesões cutâneas de hanseníase indeterminada se caracterizam histopatologicamente pela presença de infiltrado inflamatório linfo-histiocitário, em torno de anexos, vasos e nervos. Não há formação de granulomas e o diagnóstico de certeza se baseia na visualização de BAAR (Ridley, 1973). Quando estes não são identificados, o diagnóstico é presuntivo. Eventualmente, podem ser observadas alterações histopatológicas que indicam a forma clínica que estes casos vão assumir, ou seja, acúmulos de macrófagos com indícios de maturação para células epitelióides, ou com início de vacuolização.

Com as eficazes medidas de controle da epidemia, que incluem a busca ativa de casos novos e o exame dos contatos intra e extradomiciliares dos pacientes em tratamento, o número de biópsias de lesões iniciais suspeitas de hanseníase tem aumentado. Estes casos representam uma dificuldade diagnóstica, tanto para os clínicos, quanto para os patologistas.

1.4.6 Diagnóstico molecular

Como suporte aos métodos tradicionais de diagnóstico, nos últimos anos diversos estudos foram publicados usando a técnica da reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction* ou PCR) para a detecção do *M. leprae*. Na última década, foram descritos métodos envolvendo diferentes sequências e genes alvos para a amplificação do DNA do bacilo (Santos *et al*, 1993; Scollard *et al*, 1998). Recentemente, a PCR em tempo real (qPCR), um método automatizado que possibilita a quantificação dos níveis de sequências de DNA e RNA, foi um grande avanço para a detecção do *M. leprae* e de outros patógenos.

Apesar da grande especificidade demonstrada com o uso de diferentes iniciadores, a sensibilidade da técnica da PCR nos pacientes classificados como paucibacilares, nos quais há pequena quantidade de DNA do bacilo nas amostras clínicas, ainda necessita de estudos. Alguns autores compararam o uso de diferentes iniciadores e técnicas da PCR (Donoghue *et al*, 2001; Martinez *et al*, 2006; Martinez *et al*, 2009) na tentativa de estabelecer o método mais sensível. Mesmo com a grande contribuição destes estudos comparativos, o método mais sensível e específico para a detecção de material genético do *M. leprae* ainda não está

determinado.

Scollard (2006), em um trabalho de revisão de hanseníase, analisou estudos em que diferentes sistemas de detecção do *M. leprae* pela PCR foram usados. Os trabalhos analisados demonstraram que a especificidade das diferentes técnicas foi de 100% para PB e MB e a sensibilidade variou de 34% a 80% nos paucibacilares e de 90% a 100% nos pacientes classificados como multibacilares (Scollard *et al*, 2006). Goulart (2008) afirma que entre todos os genes alvos para o diagnóstico de hanseníase descritos na literatura três apresentam mais alta sensibilidade e especificidade: RLEP, Ag 85B e 16S RNA (Goulart IM e Goulart LR, 2008). Martinez (2011) testou 4 diferente genes alvo e demonstrou sensibilidade de 59,7% para o sodA, 66,1% para o Ag 85B, de 62,9% para o 16S r RNA e de 87,1% para RLEP (Martinez *et al*, 2011). Apesar desta alta sensibilidade detectada com a PCR do RLEP, a sua especificidade foi de 73% ,enquanto para os outros 3 genes foi de 100%. Estes valores de sensibilidade e especificidade se baseiam na associação da PCR com o diagnóstico clínico e histopatológico, já que não existe um padrão ouro para o diagnóstico da hanseníase.

1.5 MANEJO CLÍNICO DA HANSENÍASE PAUCIBACILAR

A eliminação da hanseníase como problema de saúde pública requer não somente o uso contínuo da poliquimioterapia, mas também a melhoria na detecção precoce de indivíduos infectados para que o tratamento seja implementado o mais breve possível.

Quando há suspeita clínica de hanseníase, mas bacilos não são identificados no raspado dérmico (pacientes PB) e os achados histopatológicos não são conclusivos, a decisão de submeter o paciente ao tratamento ou mantê-lo sob observação é do dermatologista/leprologista. Nos países endêmicos, com o objetivo de prevenir incapacidades e interromper a cadeia de transmissão, estes pacientes são frequentemente submetidos à prova terapêutica com poliquimioterapia. Esta conduta expõe não portadores de hanseníase aos efeitos colaterais das medicações e ao impacto psicológico que acompanha este diagnóstico. Além disso, diminui a precisão dos dados epidemiológicos.

Na última década, vários estudos foram publicados usando a técnica da PCR com diferentes sistemas na tentativa de estabelecer a colaboração que os métodos moleculares podem trazer para o diagnóstico da hanseníase. Até o momento, seu uso na prática clínica não está bem estabelecido. Neste estudo, demonstramos o impacto que o uso deste exame

complementar pode ter sobre o manejo clínico dos pacientes paucibacilares com exame histológico inconclusivo. Sugerimos um algoritmo que torna menos subjetiva a decisão de tratar ou manter estes pacientes sob observação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Descrever os aspectos clínicos e laboratoriais das lesões cutâneas únicas em placa em pacientes com suspeita de hanseníase e estabelecer a contribuição da PCR no diagnóstico destes casos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com lesão cutânea única em placa.
- Analisar os aspectos microscópicos presentes nos fragmentos de pele biopsiados destas lesões.
- Classificar estes pacientes qualitativamente, baseado nos critérios histopatológicos de Ridley e Jopling em alta, média e baixa probabilidade do diagnóstico de hanseníase ou em outras dermatosis.
- Identificar material genético do *M. leprae* no tecido através da reação em cadeia da polimerase.
- Verificar a associação entre os achados clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e o resultado da PCR.
- Estabelecer a contribuição da PCR para o diagnóstico da hanseníase em placa única.

3 ARTIGO

qPCR for the diagnosis of paucibacillary leprosy: impact on clinical management.

Raquel Rodrigues Barbieri¹, Anna Maria Sales¹, Milton Osório Moraes¹, Bernard Kac¹, José Augusto da Costa Nery¹, Suelen Moreira¹, Euzenir Nunes Sarno¹, Alice de Miranda Machado¹, Fernando Augusto Bozza²

Leprosy Laboratory¹, Oswaldo Cruz Institute, and Evandro Chagas Clinical Research Intitute², Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Artigo submetido à PloS Neglected Tropical Diseases em janeiro 2013.

Neste artigo estudamos 66 pacientes com suspeita de hanseníase paucibacilar na apresentação de lesão cutânea em placa única, analisamos a conduta clínica baseada somente nos aspectos clínicos e histopatológicos e mostramos o impacto que pode haver na tomada de decisão clínica quando o PCR é usado como ferramenta diagnóstica.

PLOS Neglected Tropical Diseases
qPCR for the diagnosis of paucibacillary leprosy: impact on clinical management
 –Manuscript Draft–

| | |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Manuscript Number: | |
| Full Title: | qPCR for the diagnosis of paucibacillary leprosy: impact on clinical management |
| Short Title: | P CR for the paucibacillary leprosy diagnosis |
| Article Type: | Research Article |
| Keywords: | leprosy; diagnosis; PCR; treatment |
| Corresponding Author: | Fernando A. Bozza, M.D., Ph.D. Fundação Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL |
| Corresponding Author Secondary Information: | |
| Corresponding Author's Institution: | Fundação Oswaldo Cruz |
| Corresponding Author's Secondary Institution: | |
| First Author: | Raquel Rodrigues Barbieri |
| First Author Secondary Information: | |
| Order of Authors: | Raquel Rodrigues Barbieri Anna Maria Sales Milton Ozório Moraes Bernard Kac José Augusto da Costa Nery Suelen Justo Maria Moreira Euzenir Nunes Sarno Alice de Miranda Machado Fernando A. Bozza, M.D., Ph.D. |
| Order of Authors Secondary Information: | |
| Abstract: | <p>Background: Despite a recent decline in detection rates, leprosy remains endemic in tropical regions. Frequently, disease diagnosis is based only on clinical aspects, although the bacteriological index in skin smears and histopathological examination are used to support conclusions. In paucibacillary forms, bacilli are rarely detected, and histopathological examination may not be conclusive for the diagnosis.</p> <p>Methods and Findings: In this study, we compared treatment decisions based on clinical and histopathological diagnosis with decisions based on molecular diagnosis by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) in suspected cases of paucibacillary leprosy that were presented as single-plaque skin lesions at a reference center for leprosy in Rio de Janeiro, Brazil.</p> <p>We evaluated 66 patients with single-plaque skin lesions who attended a leprosy outpatient unit between 2008 and 2011. Two independent pathologists who were blinded to the patients' clinical details performed pathological reanalysis of slides. Patients were classified as High (H), Medium (M), and Low probability (L) for the diagnosis of leprosy or as another dermatosis (O). DNA was extracted from the fragments of skin biopsies, and the levels of <i>M. leprae</i> Ag85B and 16S rDNA were estimated using qPCR amplification.</p> <p>The qPCR was positive in 46/66 (69.7%) of skin samples. Out of 66 patients, 57 (86.3%) had received treatment with multidrug therapy (MDT) based on clinical-pathological decisions. The association between previous treatment and qPCR results</p> |

| | |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| | <p>showed that among 19 patients classified as L+O, 2 qPCR-positive patients were not treated, whereas 6 patients with negative qPCR results were treated with MDT for 6 months.</p> <p>Conclusions: The diagnosis of single leprosy skin lesions is challenging even to experienced dermatologists and pathologists. The inter-observer variation should be considered. These data demonstrated that in suspected cases of leprosy in which the typical histopathological features were not present, the use of qPCR could help the clinical decision.</p> |
| <p>Suggested Reviewers:</p> | <p>David M Scollard, MD, PhD National Hansen's Disease Programs, 1770 Physician Park Dr., Baton Rouge, LA 70816, USA DScollard@hrsa.gov</p> <p>Thomas P. Gillis, PhD Louisiana State University Medical Center New Orleans, LA tgillis@lsu.edu</p> <p>Diana Williams, PhD School of Veterinary Medicine Louisiana State University Baton Rouge, LA DWilliams2@hrsa.gov Research focus on pathogenesis of Mycobacterium leprae and development of molecular methods for diagnosis</p> <p>Pushpendra Singh, PhD Institut de recherche en infectiologie, Faculté des sciences de la vie, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne pushpendra.singh@epfl.ch Comparative genomic and phylogeographic analysis of leprosy bacilli</p> |
| <p>Opposed Reviewers:</p> | |

qPCR for the diagnosis of paucibacillary leprosy: impact on clinical management.

Authors

Raquel Rodrigues Barbieri¹, Anna Maria Sales¹, Milton Ozório Moraes¹, Bernard Kac¹, José Augusto da Costa Nery¹, Suelen Justo Maria Moreira¹, Euzenir Nunes Sarno¹, Alice de Miranda Machado¹, and Fernando Augusto Bozza²

Leprosy Laboratory¹, Oswaldo Cruz Institute, and Evandro Chagas Clinical Research Institute², Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ABSTRACT

Background: Despite a recent decline in detection rates, leprosy remains endemic in tropical regions. Frequently, disease diagnosis is based only on clinical aspects, although the bacteriological index in skin smears and histopathological examination are used to support conclusions. In paucibacillary forms, bacilli are rarely detected, and histopathological examination may not be conclusive for the diagnosis.

Methods and Findings:

We studied 66 patients evaluated in a reference center for leprosy in Rio de Janeiro, Brazil, between 2008 and 2011. They were all suspect of paucibacillary leprosy and had single skin lesions. After the retrospective collection of epidemiological and clinical data, two independent pathologists who were blinded to the patients' clinical details performed pathological reanalysis of slides. Patients were histopathologically classified as High (H), Medium (M), and Low probability (L) for the diagnosis of leprosy or as another dermatosis

(O). DNA was extracted from the stored fragments of skin biopsies, and the levels of *M. leprae* specific antigens Ag85B and 16S rDNA were estimated using qPCR amplification.

Results: The qPCR was positive in 46/66 (69.7%) of skin samples. Out of 66 patients, 57 (86.3%) had received treatment with multidrug therapy (MDT) based on clinical-pathological routine. Considering previous decision towards treatment and its association with qPCR results, we showed that among 19 patients histopathologically classified as low probability and other dermatosis, 2 qPCR positive patients had not been treated, whereas 6 patients with negative qPCR had been treated with MDT for 6 months.

Conclusions: The diagnosis of single leprosy skin lesions is challenging even to experienced dermatologists and pathologists. These data demonstrated that in suspected cases of leprosy in which the typical histopathological features were not present, the use of qPCR could help the clinical decision.

Key words: leprosy, diagnosis, PCR, treatment

Running title: PCR for the paucibacillary leprosy diagnosis

AUTHOR SUMMARY (189 words)

Despite recent declines in detection rates, leprosy remains endemic in countries such as Brazil and India. Early identification and treatment remain the most effective way to prevent disease transmission and disability. Leprosy diagnosis is based on clinical aspects combined with bacteriological and histopathological features.

In paucibacillary leprosy, the differential diagnosis with other skin diseases is often a challenge. Early-stage leprosy can present as unique skin lesions, confounding diagnosis and requiring more precise investigation. We studied patients with single-plaque skin lesions with suspected leprosy at a Referral Leprosy Center in Rio de Janeiro, Brazil. The clinical and epidemiological aspects were collected, and the skin biopsies were assessed by two pathologists for diagnosis. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed in all specimens.

Our results indicated that single skin lesion diagnosis is difficult even for experienced dermatologists and pathologists who specialize in leprosy. When the clinical and histopathological diagnoses of leprosy were not conclusive, the use of the qPCR proved useful to confirm early cases, aiding the clinical decision and ensuring correct treatment allocation. Additionally, more accurate diagnostics can prevent people without leprosy from being submitted to unnecessary treatment.

INTRODUCTION:

The forty-fourth World Health Assembly in 1991 established leprosy elimination as a target by the year 2000 [1]. However, the World Health Organization (WHO) at the end of 2011 reported more than 220,000 new cases of leprosy registered worldwide in the previous year. Brazil reported 33,955 new cases in the same period, indicating that active transmission of *M. leprae* was occurring despite more than two decades of effective multidrug therapy (MDT) [2].

Early diagnosis has been identified as one of the cornerstones for disease control. The diagnosis of leprosy is usually based on the presence of skin lesions with reduced sensitivity with or without a palpable peripheral nerve trunk. A positive bacteriological index in skin smears or typical histological findings confirm the diagnosis. However, sensory losses may be present in the infiltrated skin in other dermatosis, and frequently, initial lesions of leprosy may present preserved sensibility. Although bacilli can be clearly identified in multibacillary (MB) forms, in paucibacillary (PB) forms, bacilli are rarely identified in dermal scraping. Additionally, histopathological examination may not be conclusive in PB forms, even for an experienced pathologist, especially when classical features are not present and nerve inflammation is not identified [3] [4]. Therefore, the decision to begin treatment is often based only on clinical suspicion.

Single leprosy skin lesions are considered one of the earliest clinical forms of PB leprosy but their clinical and histopathological findings are similar to the aspects of the lesion of other dermatosis, rendering the differential diagnosis a challenge.

In recent years, polymerase chain reaction (PCR) has emerged as a fast and reliable method for the diagnosis of several infectious diseases, including leprosy. Thereafter, PCR methods

have been developed to amplify specific target genes of *M. leprae* [5] [6]. Recently, real-time quantitative PCR (qPCR) was introduced, improving specificity and sensitivity in comparison with conventional PCR techniques for the quantification of bacterial DNA or cDNA content directly in clinical samples [7] [8] [9].

The use of molecular diagnostics when histopathology is inconclusive could ensure that leprosy patients are treated early, avoiding sequelae. For patients with other dermatosis, the determination of the diagnosis will both prevent the complications associated with unnecessary treatment and prevent the stigma of leprosy diagnosis. Finally, a more accurate diagnosis can provide better surveillance data and strategies for disease control.

In this study, we evaluated the utility of qPCR for the diagnosis of early paucibacillary leprosy presented as single-plaque skin lesions. In this context, the results yielded from qPCR were compared with those obtained from the standard approaches. Furthermore, the changes in diagnosis and how this information impacted the recommended conduct were also evaluated.

METHODS:

Ethics Statement

The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all patients or their legal representatives prior to any study-related procedure. The Institutional Review Board approved the study protocol (Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, CAAE 0059.0.009.000-11).

Design and setting

This observational study involved a cohort of patients from the Leprosy Outpatient Clinic, a

National Reference Center at the Oswaldo Cruz Foundation – Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil. The cohort was followed from 1987 to 2011, during which time 3064 leprosy patients were registered. The Leprosy Clinic receives approximately 650 patients per year to confirm leprosy diagnosis.

Patients

The patients were selected from Leprosy Outpatient Clinic database. We included all individuals presenting a skin single plaque who were suspected of having leprosy, evaluated from January 2008 to December 2011, that had performed skin biopsies for etiological studies. Patients suspected of recurring leprosy, patients with a positive bacteriological index (BI) of a slit skin smear, and patients with insufficient material available for reanalysis were excluded.

Data collection

A standardized data entry form was created to record the following epidemiological, clinical and laboratory data: a) sex, b) age, c) history of contact with leprosy patients d) the age of the skin lesion e) characteristics of the skin lesion: color, body segment location, size at the largest diameter (cm) and thermal skin sensation changes (decrease or loss), f) Mitsuda reaction (positive $>$ or $=$ 5mm) g) bacteriological index and h) clinical decision regarding MDT treatment based on routine histological evidence.

Histopathological examination For these study, two independent pathologists who were blinded to the patients' clinical details performed pathological re-analysis of all patients' stored slides. The following features were analyzed: i) Epidermal variables: acanthosis, exocytosis, erosion of the basal layer of the epidermis by an inflammatory infiltrate,

parakeratosis, hyperkeratosis, and spongiosis. ii) Dermal variables: composition of the inflammatory infiltrate (lymphocytes, macrophages, epithelioid cells, Langhans giant cells, foreign body cells, or plasma cells); distribution of the infiltrate (superficial, deep, perivascular, perineural, periglandular or within the erector pili muscle); architecture of the infiltrate (no granuloma or epithelioid granuloma); nerve fibers (preserved, unidentified, or infiltrated); and necrosis. All variables were classified as “yes” or “no”, referring to their presence or absence.

Finally, the pathologists classified all cases according to the probability of the leprosy diagnosis based on the histological Ridley criteria [11]:

- **High probability (H):** evidence of nerve involvement by inflammatory infiltrate.
- **Medium probability (M):** presence of granulomatous inflammatory infiltrate with unidentified nerve bundles.
- **Low probability (L):** sparse granulomatous inflammatory infiltrate and preserved cutaneous nerves or non-granulomatous inflammatory infiltrate and cutaneous nerves unidentified.
- **Other dermatosis (O):** histopathological features of other dermatosis.

When the two pathologists disagreed about the classification, a third experienced pathologist defined the final classification.

DNA extraction and PCR

DNA was extracted from 66 skin biopsy specimens that had been stored at -80°C, using the DNeasy kit (Qiagen, INC, Valencia, CA) according to the manufacturer’s recommendations. The levels of *M. leprae* Ag 85B DNA [7] and 16S rDNA [8] in the skin biopsy specimens were estimated using Taq Man qPCR amplification (Life Technology Corporation). All qPCR conditions are previously described [9]. Briefly, reaction mixtures were prepared in duplicate for each target and subjected to 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, and 40 cycles of denaturing for 15 seconds and annealing/extension at 60°C for 60 seconds using a Step One

Real Time system (Life Technology Corporation).

Fluorescence accumulation data were captured by the Step One Sequence Detection System software (Life Technology Corporation) and ΔRn values were extracted to estimate the cycle threshold (Ct) that was compared to standard curves using *M. leprae* DNA according to previously described [9]. The Ct values of skin sample DNAs were interpolated in the standard curves and for the analysis performed here the PCR result was ascertained as a dichotomous variable (positive or negative) when a result was considered positive if amplification was detected resulting in a Ct value lower than the 38th cycle in at least one amplified target gene [9].

Statistical Analysis

Simple frequencies and measures of central tendency and dispersion of the clinical, epidemiological and histopathological variables were obtained. Categorical variables were analyzed with the statistical chi-squared test with Yates continuity correction whenever indicated. The level of significance was set at 5% for all tests. The concordance between the pathologists in relation to the histopathological classification was determined by calculating the observed agreement and Kappa values (k). The Kappa values were interpreted according the scale proposed by Altman [12] <0.20: poor agreement beyond chance; from 0.21 to 0.40: reasonable agreement; from 0.41 to 0.60: moderate agreement; from 0.61 to 0.80; good agreement; and from 0.81 to 1.00: very good agreement beyond chance. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 16.0) was used for data analysis.

RESULTS

Epidemiological and clinical data

Among 86 initially recruited patients presenting a single plaque, 18 were excluded because

there were not enough skin fragments for PCR analysis, and 2 were excluded due to a positive BI from the slit skin smear test. A total of 66 patients were analyzed.

Table 1 shows the clinical and epidemiological characteristics of the patients. Most of the cases were female (59%). The median age was 48 years (ranging from 12 to 77 years). The duration of the lesions varied from 2 weeks to 20 years, but in 48 of 66 cases (72.7%), the lesion was less than two years old. There was a predominance of small skin lesions (median 4 cm, ranging from 1 to 30 cm), and the upper and lower limbs were the most frequently affected segments (85%). Reduction or loss of cold thermal sensation of the skin lesions was found in 98.4% of the patients. Tactile and pain sensitivity was measured in 44 patients. Tactile sensitivity was abnormal in 33 patients, and pain sensitivity was abnormal in 22 cases. Half of the patients had a lepromin test equal to or greater than 5 cm. All patients were from the metropolitan region of Rio de Janeiro, and 15 patients (23%) had a history of contact with leprosy patients.

Histopathological analysis

The main histopathological findings are presented in table 2. Briefly, lymphocytes, epithelioid cells, epithelioid granuloma, and superficial and deep perivascular infiltrates were the most common findings in the dermis. Infiltrated nerves were reported in 45.5% of cases by pathologist 1 and in 39.4% of cases by pathologist 2. The concordance between the pathologists for this variable, calculated by kappa coefficient, was moderate (0.57). This data shows that pathologists identified infiltrated nerves in different cases. However, there were a good or very good agreement in the following variables: lymphocytes, epithelioid cells, architecture of infiltrate and its location (superficial, deep and perivascular).

Table 3 shows the classification of the probability (HMLO) of a leprosy diagnosis. The observed agreement between the two pathologists for this classification was 0.62 for the

Kappa coefficient, which represents a good agreement. After the third pathologist's examination, the final HMLO histopathological classification was defined, and 45.5% of cases were classified as High probability, 25.7% as Medium and 7.5% as Low probability. Fourteen patients (21.2%) were classified as other dermatosis. The sum of the High and Medium probabilities comprised 71.2% of the sample (Table 4).

PCR Analysis and its association with histopathological findings and treatment

There was a higher frequency of positive amplification for the gene 16S (54.54%) compared with the gene Ag85B (31.81%) (data not shown). The combination of positive results from both assays showed that the PCR was positive in 46/66 (69.7%) skin samples (data not shown).

Patients classified as High or Medium probability (H+M) and low probability or other dermatosis (L+O) were grouped to assess the association between the histopathological classification (HMLO), treatment and the PCR results.

Among the 47 patients classified as H+M, 82,9% had a positive PCR and among 19 patients classified as L+O, 63.1% were PCR-negative. A statistically significant association was found between the histopathological classification and the PCR results ($p < 0.001$) (Table 4).

Table 5 shows that 3 (4.5%) PCR-positive patients were not treated and that 14 (21.2%) PCR-negative patients received MDT. Among those 14 treated PCR-negative patients, 6 patients were classified by histopathology as L+O. We believe that these patients could remain under observation without MDT. Three PCR positive patients were not treated, and 2 of them were classified as L+O. If PCR had been used as a diagnostic tool, these patients would have been treated.

DISCUSSION

The main findings from this study support the employment of PCR as a useful diagnostic tool for paucibacillary leprosy. Indeed, PCR is helpful when histopathology is inconclusive, so that clinicians can diminish the ambiguity of the clinical decision by using a reliable test.

This study has limitations, including the absence of a clear “gold standard” outcome. This limitation is intrinsic to the studied form of leprosy because the bacilli cannot be directly identified or cultivated. Additionally, the spontaneous resolution of a skin lesion can occur, and other dermatosis could respond to MDT. Another potential limitation is that the clearance of bacilli by the immunological response of the host could cause the availability of DNA in the tissue to be lower than the molecular methods could identify. Moreover, the cost of molecular biology methods and the shortage of trained technicians is an issue to be considered.

The clinical presentation of leprosy is changing even in endemic countries, and the diagnosis of leprosy lesions in early stages is of pivotal importance to the leprosy control program [13]. In recent years, with the introduction of more efficient strategies of disease control, the proportion of PB cases has been increasing. A single skin lesion is a common presentation of PB and an early form of leprosy. The epidemiological and clinical relevance of this presentation has been of interest to different groups [13] [14]. In this study, we included patients with single lesions in plaques because the differential diagnosis of this form from other dermatosis remains a challenge in clinical practice.

Single lesions of leprosy are more often observed in females than males, most likely because females are more attentive to their health [15]. Pönnighaus and colleagues (1990) showed that skin lesions in females are more frequently found on the face and arms [16]. Although there were more women than men in this study, the preferential lesion location among both males

and females was on the legs. Seventy-two percent of all lesions had been observed by the patients for less than two years, thus corroborating previous reports suggesting that single lesions are an initial presentation of leprosy [14]

The presence of hypoesthesia in a skin lesion is one of the cardinal signs of leprosy and is considered essential for the diagnosis of paucibacillary forms. Hypoesthesia can be assessed by thermal, pain and sensory tests; however, similar accuracy has been demonstrated for its diagnosis between the three tests when pathological diagnosis was used as a reference [17]. In the present study, the presence of hypoesthesia was not useful for the diagnosis because this characteristic was present in almost all studied patients (98%). Moreover, these tests depend on the skill and experience of the testers, as well as the patient's capacity to comprehend the exam [18] [19]. The subjectivity of this evaluation has been demonstrated by other authors with unsatisfactory inter-observer agreement of skin lesion sensory tests (Kappa 0.4 and <0.6) [20]

In this study, we observed a high agreement among pathologists when typical aspects of leprosy were present; however, when typical aspects were not present, the agreement was lower, and the analysis was more subjective. Previous studies have shown both the value and the limitations of histopathology in the diagnosis of leprosy skin lesions [21] [22] [23]. Fine and colleagues (1993) analyzed the variation in the histological diagnosis of leprosy and observed that disagreement was present not only between pathologists but also in two evaluations by the same pathologist on two different occasions [24].

The inflammatory changes of intracutaneous nerves are considered a key finding for leprosy diagnosis in skin samples. Nevertheless, the interpretation of these changes may be challenging. The difficulty in visualizing inflammatory infiltrates within nerve bundles of the dermis is one of the limitations of the histopathological diagnosis of PB [25] [26]. In this

study, the two pathologists observed nerve involvement with similar frequency, but the agreement between them, calculated using the Kappa value, was moderate because the pathologists observed inflamed nerves in different cases.

Among patients classified as low probability and other dermatosis (L + O), the decision to treat was based on clinical findings. To obtain a more accurate diagnosis of inconclusive histopathological PB cases, we decide to perform a PCR of all skin samples and evaluate its utility in clinical practice.

PCR for the detection of *M. leprae* has been improving consistently in the past few years [27], especially after the advent of real-time PCR [7] [8]. However, the comparison of PCR with any other test for leprosy diagnosis is very difficult because no gold standard exists. Recently, in an attempt to validate PCR, we attempted to compare archived samples that were diagnosed with leprosy or other dermatosis as defined by clinical and histopathological analysis [9]. At that time, we tested 4 different PCR assays, and surprisingly, the highest sensitivity was detected with PCR for RLEP, but with a low specificity. To decrease the ambiguity (due to the low specificity), we decided to use 16S DNA and Ag85B PCR assays. Because the outcome was defined by the clinicians (treatment), our results combining histopathological and molecular analysis exhibited the high accuracy that PCR or histopathological examination alone could achieve. Nevertheless, the main disagreement between PCR and histopathology vs. previous clinical decision occurred in 8 patients (2 PCR-positive and 6 PCR-negative) for whom PCR could have been useful for a more precise management.

Our data demonstrated that there was significant agreement between the histopathological diagnosis and the result of PCR. When we compared these complementary methods with the clinical decision to treat patients with MDT, we observed that for patients classified as H and M, the use of PCR would not have changed the therapeutic decision. Conversely, for patients

classified as L and O, the use of PCR could have lead toward a different outcome (Fig. 1). PCR would then avoid missing early leprosy patients and prevent the exposure of individuals with others dermatosis to the harmful effects of drugs.

In conclusion, the diagnosis of single leprosy skin lesions is challenging even to experienced dermatologists and pathologists, and inter-observer variation should be considered. We propose that molecular assays can become a useful tool in those cases and may increase the accuracy of the diagnosis in this form of leprosy.

REFERENCES:

1. WHO. Leprosy Resolution WHA 44.9, Forty-fourth World Health Assembly, 13 May 1991. Geneva.
2. WHO. World Health Organization. Weekly Epidemiological Record 2012 87: 317-328
3. Nayar A, Narayanan JS, Job CK (1972) Histopathological study of early skin lesions in leprosy. Arch Path 94: 199-204.
4. Ridley DS (1973) The pathogenesis of the early skin lesion in leprosy. J Path 111: 191-205.
5. Donoghue HD, Holton J, Spigelman M (2001) PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. J Med Microbiol 50: 177-182.
6. Santos AR, De Miranda AB, Sarno RN, Suffys PN, Degraeve WM (1993) Use of PCR – mediated amplification of *Mycobacterium Leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. J Med Microbiol 39: 298-304
7. Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, et al. (2006) Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. J Clin Microbiol 44: 3154-3159.
8. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, et al. (2009) Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. J Clin Microbiol 47: 2124-2130.
9. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO (2011) Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. PloS Negl Trop Dis 5(10): e1354.
10. Ridley DS, Jopling WH (1962) A classification of leprosy for research purposes. Leprosy review 33: 119-28
11. Ridley DS (1974) Histological classification and the immunological spectrum of leprosy.

- Bull World Health Organ 51: 451-465.
12. Altman DG (1991) Practical statistics for medical research. London: Chapman and Hall.
 13. Halder A, Mishra RN, Halder S, Mahato L, Saha AK (2001) Impact of modified leprosy elimination campaign in a MDT pilot project district of India. *Indian J Public Health* 45: 88-92.
 14. Ignotti E, Bayona M, Alvarez-Garriga C, Andrade V, Valente J (2007) Single Lesion as an indicator to monitor the leprosy trend to elimination in hyperendemic areas. *Rev Bras Epidemiol* 10: 421-431
 15. Oliveira MH, Romanelli G (1998) Os efeitos da Hanseníase em homens e mulheres: um estudo de gênero. *Cad Saúde Pública* 14: 51-56.
 16. Pönnighaus JM, Fine PE, Gruer PJ, Maine N (1990) The anatomical distribution of single leprosy lesions in an African population, and its implications for the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev* 61: 242-250.
 17. Pönnighaus JM, Fine PE (1989) Leprosy. A Comparison of sensory loss tests and histopathology in the diagnosis of leprosy *Lepr Rev* 60: 20-27
 18. Shumin Chen, Wang Qihua, Chu Tongsheng, Zhen Ming (2006) Inter-observer reliability in assessment of sensation of skin lesion and enlargement of peripheral nerves in leprosy patients *Lepr Rev* 77: 371-376
 19. Van Brakel WH, Khawas IB et al. (1996) Intra and inter-tester reliability of sensibility testing in Leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 64: 287-298.
 20. Gupte MD, Vallishayee RS, Nagaraju B, Ramalingam A, Lourdusamy G, et al. (1990) Inter-observer agreement and clinical diagnosis of leprosy for prophylaxis studies. *Indian J Lepr.* 62: 281-295.
 21. Fine PE, Job CK, McDougall AC, Meyers WM, Pönnighaus JM (1986) Comparability among histopathologists in the diagnosis and classification of lesions suspected of

- leprosy in Malawi. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 54: 614-625.
22. Lockwood DN, Lucas SB, Desikan KV, Ebenezer G, Suneetha S, et al (2008) The histological diagnosis of leprosy type 1 reactions: identification of key variables and an analysis of the process of histological diagnosis. *J Clin pathol* 61: 595-600
 23. Lockwood DN, Nicholls P, Smith WC, Das L, Barkataki P, van Brakel W, et al. (2012) Comparing the clinical and histological diagnosis of leprosy and leprosy reactions in the INFIR cohort of Indian patients with multibacillary leprosy. *PloS Negl Trop Dis* 6(6): e1702
 24. Fine PE, Job CK, Lucas SB, Meyers WM, Pönnighaus JM, Sterne JA (1993) Extent, origin, and implications of observer variation in the histopathological diagnosis of suspected leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 61(2):270-82.
 25. Fleury RN, Bacchi, CE (1987) S-100 protein and immunoperoxidasetechnique as an aid in the histopathologic diagnoses of leprosy. *Int J Leprosy* 55(2) p. 338-344.
 26. Gupta SK, Nigam S, Mandal AK, Kumar V (2006) S-100 as a useful auxiliary diagnostic aid in tuberculoid leprosy. *J Cutan Pathol* 33(7): 482-486.
 27. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL (2006) The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19: 338-381.

TABLES:**Table 1:** Clinical and Epidemiological Findings (N=66)

| Variables | Class | N | % |
|-------------------------------|----------------------|--------------------|----------|
| Sex | male | 27 | 40.9 |
| | female | 39 | 59.0 |
| Age | median | 48.0 | |
| | mean (\pm SD) | 45.5 (\pm 15.8) | |
| Contact | household | 8 | 12.1 |
| | outside of household | 7 | 11.0 |
| | no history | 51 | 77.2 |
| Size | median | 4.0 | |
| | mean (\pm SD) | 5.8 (\pm 5.1) | |
| Location | head | 4 | 6.0 |
| | trunk | 5 | 7.5 |
| | upper limbs | 25 | 37.8 |
| | lower limbs | 31 | 46.9 |
| | NR | 1 | 1.5 |
| Change in sensitivity | thermal | 65 | 98.4 |
| | pain* | 33 | 50.0 |
| | tactile* | 22 | 33.3 |
| Duration of the lesion | < 2 years | 48 | 72.7 |
| Treatment (MDT) | | 57 | 86.3 |
| Mitsuda Reaction | ≥ 5 | 33 | 50.0 |

SD= standard deviation;

NR not registered

* Evaluated in 44/66

Table 2: Frequency of pathological findings and agreement between two pathologists calculated by Kappa coefficient (n=66)

| | Pathologist 1 n (%) | Pathologist 2 n (%) | Kappa |
|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Epidermal Findings | | | |
| Rectification of Ridges | 23 (34.8%) | 20 (30.3%) | 0.35 |
| Erosion of the Basal Layer | 18 (27.2%) | 10 (15.1%) | 0.64 |
| Exocytosis of Lymphocytes | 35 (53.0%) | 39 (59.0%) | 0.51 |
| Parakeratosis | 9 (13.6%) | 7 (10.6%) | 0.86 |
| Hyperkeratosis | 9 (13.6%) | 7 (10.6%) | 0.43 |
| Spongiosis | 7 (10.6%) | 3 (4.5%) | 0.15 |
| Acanthosis | 10 (15.1%) | 9 (13.6%) | 0.94 |
| Composition of Infiltrate | | | |
| Lymphocytes | 66 (100.0%) | 66 (100.0%) | |
| Macrophages | 64 (96.9%) | 32 (48.5%) | -0.002 |
| Epithelioid cells | 46 (69.7%) | 50 (75.7%) | 0.7 |
| Plasma | 7 (10.6%) | 9 (13.6%) | 0.29 |
| Neutrophils | 3 (4.55%) | 2 (3.0%) | 0.38 |
| Eosinophils | 4 (6.0%) | 1 (1.5%) | 0.38 |
| Langhans Giant Cells | 22 (33.3%) | 19 (28.8%) | 0.54 |
| Foreign Body Giant Cells | 7 (10.6%) | 1 (1.5%) | -0.03 |
| Architecture of Infiltrate | | | |
| No Granuloma | 21 (31.8%) | 21 (31.8%) | 0.66 |
| Epithelioid Granuloma | 45 (68.2%) | 45 (68.2%) | |
| Location of Infiltrate | | | |
| Superficial | 66 (100.0%) | 66 (100.0%) | |
| Deep | 54 (81.8%) | 53 (80.3%) | 0.95 |
| Perivascular | 66 (100.0%) | 66 (100.0%) | |
| Perineural | 41 (62.1%) | 31 (46.9%) | 0.52 |
| Periglandular | 34 (51.5%) | 50 (75.7%) | 0.32 |
| Hair Erector Muscle | 9 (13.6%) | 11 (16.6%) | 0.53 |
| Dermal Nervous | | | |
| Preserved | 19 (28.8%) | 12 (18.2%) | 0.54 |
| Unidentified | 17 (25.7%) | 26 (39.4%) | 0.5 |
| Infiltrated | 30 (45.5%) | 26 (39.4%) | 0.57 |
| Dermal Findings | | | |
| Necrosis | 8 (12.1%) | 4 (6.0%) | 0.64 |

Table 3: Histopathological classification for leprosy diagnosis and agreement between pathologists calculated by Kappa coefficient

| Classification | Pathologist 1 | Pathologist 2 | Final Classification |
|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------------|
| H | 30 (45.5%) | 26 (39.4%) | 30 (45.5%) |
| M | 14 (21.2%) | 21 (31.8%) | 17 (25.7%) |
| L | 6 (9.1%) | 5 (7.5%) | 5 (7.5%) |
| O | 16 (24.3%) | 14 (21.2%) | 14 (21.2%) |

H: high, M: medium, L: low, O: other dermatosis

Kappa value = 0.62

Agreement beyond chance according to Altman (1991):

<0.20: poor agreement

0.21 to 0.40: reasonable agreement

0.41 to 0.60: moderate agreement

0.61 to 0.80: good agreement

0.81 to 1.00: very good agreement

Table 4: Histopathological classification associated with the results of qPCR

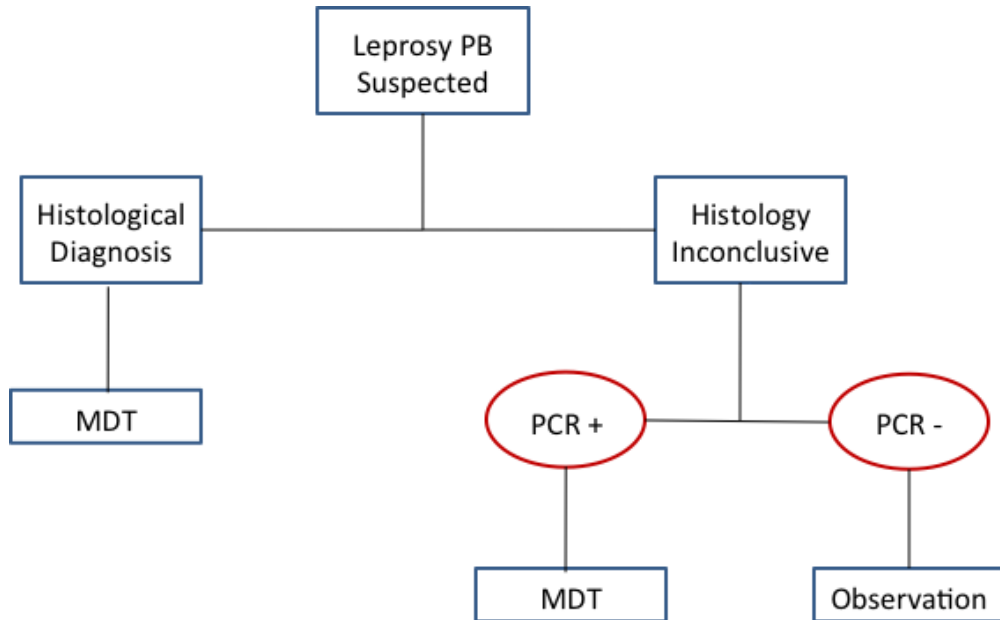
| Classification | PCR + | PCR - | Total |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|
| High + Medium | 39 (59.0%) | 8 (12.2%) | 47 (71.2%) |
| Low + Others | 7 (10.6%) | 12 (18.1%) | 19 (28.8%) |
| Total | 46 (69.6%) | 20 (30.3%) | 66 |

Chi-squared test < 0.001

Table 5: Treatment (MDT/OMS) associated with the results of PCR

| Treatment | PCR + | PCR - | Total |
|------------------|--------------|--------------|--------------|
| Yes | 43 (65.1%) | 14 (21.2%) | 57 (86.3%) |
| No | 3 (4.5%) | 6 (9.1%) | 9 (13.6%) |
| Total | 46 (69.6%) | 20 (30.3%) | 66 |

Figure 1: Algorithm proposed for PCR application for the clinical management of paucibacillary leprosy



4 CONCLUSÕES

- As características epidemiológicas dos pacientes estudados como: sexo, idade e história de contato, intra ou extra domiciliar, com pacientes portadores de hanseníase não colaboraram para o diagnóstico das lesões única em placa suspeitas de hanseníase.

- Entre os achados clínicos, a diminuição da sensibilidade da lesão cutânea, considerada sinal/sintoma característico da hanseníase, não foi útil para o diagnóstico diferencial entre lesões de hanseníase em placa única e lesões cutâneas de outras dermatosis, pois 98% dos pacientes apresentavam alteração da sensibilidade térmica.

- A análise das alterações microscópicas e classificação histopatológica, realizada por dois patologistas deixou evidente a influência do caráter interpretativo do exame histopatológico. A dificuldade de caracterização de filetes nervosos agredidos pelo infiltrado inflamatório foi a principal limitação para a conclusão do diagnóstico histopatológico da hanseníase nos casos com lesão única em placa.

- A associação entre os aspectos clínicos (tratamento com PQT), classificação histopatológica e o resultado do PCR mostrou que nos pacientes classificados como B ou O, o uso do PCR poderia ter orientado a tomada de decisão do dermatologista em 42% (8/19) destes casos.

- Estabelecemos que, em casos suspeitos de hanseníase com lesão única em placa, nos quais bacilos não são identificados no raspado dérmico e o exame histopatológico é inconclusivo, o uso do qPCR aumenta a precisão diagnóstica e diminui a subjetividade da conduta clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brasil, Ministério da Saúde. Guia para Controle da Hanseníase, Brasília 2002.

Brasil, Ministério da Saúde. Manual de Prevenção de Incapacidades Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 3.ed., Rev. Ampl. Brasília (DF) Ministério da Saúde, 2008.

Brasil, Ministério da saúde, Boletim epidemiológico, 2012.

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/indi_epidemiologicos_operacionais_hans_br2000_2011.pdf

Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet* 2004;363:1209-19.

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(5):1991-5.

Cavalcanti AA, Lucena-Silva N, Montarroyos UR, Albuquerque PM. Concordance between expected and observed bacilloscopy results of clinical forms of leprosy: a 6-year retrospective study in Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45(5):616-9.

Chen S, Wang Q, Chu T, Zheng M. Inter-observer reliability in assessment of sensation of skin lesion and enlargement of peripheral nerves in leprosy patients. *Lepr Rev* 2006;77(4):371-6.

Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, Fajardo TT Jr, Balagon MV, Abalos RM, et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8(1):138-42.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001;409:1007-11.

Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol* 2001;50(2):177-82.

Düppre NC, Camacho LA, Sales AM, Illarramendi X, Nery JA, Sampaio EP, et al. Impact of PGL-I seropositivity on the protective effect of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(6):e1711.

Fine PE, Job CK, McDougall AC, Meyers WM, Ponnighaus JM. Comparability among histopathologists in the diagnosis and classification of lesions suspected of leprosy in Malawi. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1986;54(4):614-25.

Fine PE, Job CK, Lucas SB, Meyers WM, Pönnighaus JM, Sterne JA. Extent, origin, and

implications of observer variation in the histopathological diagnosis of suspected leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993;61(2):270-82.

Fine PE, Sterne JA, Pönnighaus JM, Bliss L, Sauji J, Chihana A, et al. Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. *Am J Epidemiol* 1997;146(1):91-102.

Fitzpatrick TB. *Dermatology in General Medicine*. 5ª edição. International Edition;1999; Vol. 1, chapter 4, p 21

Fleury RN, Bacchi CE. S-100 protein and immunoperoxidase technique as an aid in the histopathologic diagnosis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1987;55(2):338-44.

Godal T. Leprosy immunology-some aspects of the role of the immune system in the pathogenesis of disease. *Lepr Rev* 1984;55(4):407-14.

Goulart IM, Goulart LR. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res* 2008;300(6):269-90.

Gupta SK, Nigam S, Mandal AK, Kumar V. S-100 as a useful auxiliary diagnostic aid in tuberculoid leprosy. *J Cutan Pathol* 2006;33(7):482-6.

Hatta M, van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995;89(4):381-5.

Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1997;65(4):461-4.

Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78(3):518-21.

Lever WF *Histopatologia da pele*. 7ª ed. Editora Manole LTDA; 1991, capítulo 17, p 303.

Lienhardt C, Fine PE. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation? *Lepr Rev* 1994;65(1):9-33.

Lockwood DNJ, Suneetha S. Leprosy: too complex disease for a simple elimination paradigm. *Bull WHO*, 2005; 83:230-5.

Lockwood DN, Nicholls P, Smith WC, Das L, Barkataki P, van Brakel W, Suneetha S. Comparing the clinical and histological diagnosis of leprosy and leprosy reactions in the INFIR cohort of Indian patients with multibacillary leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6(6):e1702.

Madri, 1953. 7º Congresso Internacional de Leprologia. Memória Madri: Associação Internacional de La Lepra, 1953.

Martinez AN, Britto CF, Nery JA, Sampaio EP, Jardim MR, Sarno EN, et al. Evaluation of

real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3154-9.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2009;47(7):2124-30.

Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(10):e1354.

Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol* 1983;8(2):182-9.

Modlin RL, Rea TH. Leprosy: new insight into an ancient disease. *J Am Acad Dermatol* 1987;17(1):1-13.

Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, ed. *Leprosy*, 2nd edn. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1994: 29-48.

Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev* 2003;74(3):196-205.

Pedley JC. Transmission of leprosy. Chatterjee, BR- *The window on leprosy* Wardhs: Gandhi Memorial Leprosy Foundation. 1978 54-58.

Penna ML, de Oliveira ML, Penna GO. The epidemiological behaviour of leprosy in Brazil. *Lepr Rev* 2009;80(3):332-44.

Rambukkana A, Salzer JL, Yurchenco PD, Tuomanen EI. Neural targeting of *Mycobacterium leprae* mediated by the G domain of the laminin-alpha2 chain. *Cell* 1997;88(6):811-21.

Ramos T, Zalberg-Quintana I, Appelberg R, Sarno EN, Silva MT. T-helper cell subpopulations and the immune spectrum of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1989;57(1):73-81.

Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev* 1962;33:119-28.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1966;34(3):255-73.

Ridley DS. The pathogenesis of the early skin lesion in leprosy. *J Pathol* 1973;111(3):191-206.

Ridley DS. . Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ* 1974;51(5):451-65.

Sampaio S, Rivitti E. *Dermatologia*. 3ª edição. Artes Médicas; 2007: 624-51.

Scollard DM, Gillis TP, Williams DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol* 1998;109:642-6.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006;19(2):338-81.

Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr* 1962;30:291-306.

Sousa AL, Stefani MM, Pereira GA, Costa MB, Rebello PF, Gomes MK, et al. *Mycobacterium leprae* DNA associated with type 1 reactions in single lesion paucibacillary leprosy treated with single dose rifampin, ofloxacin, and minocycline. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77(5):829-33.

Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, Hacker MA, Nery JA, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(3):e1013.

Santos AR, De Miranda A, Sarno EN, Suffys PN, Degrave WM. Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1993; 39:298-304.

Santos AR, Nery JC, Duppre NC, Gallo ME, Filho JT, Suffys PN, et al. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1997;46(2):170-2.

Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001;32(1):76-102.

Talhari S, Neves R, Penna G, De Oliveira M. Hanseníase. 4ª edição. Manaus; Gráfica Tropical; 2006.

Tolentino JG. Acute manifestations of leprosy. *Int J Lepr* 1965;33(3):Suppl:570-7.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med* 2011;364(17):1626-33.

Ustianowski AP, Lockwood DN. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(5):421-7.

van Brakel WH, Khawas IB, Gurung KS, Kets CM, van Leerdam ME, Drever W. Intra- and inter-tester reliability of sensibility testing in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1996;64(3):287-98.

Van Brakel WH, Nicholls PG, Das L, Barkataki P, Maddali P, Lockwood DN, et al. The INFIR Cohort Study: assessment of sensory and motor neuropathy in leprosy at baseline. *Lepr Rev* 2005;76(4):277-95.

Van Voorhis WC, Kaplan G, Sarno EN, Horwitz MA, Steinman RM, Levis WR, et al. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell

phenotypes. *N Engl J Med* 1982;307(26):1593-7.

Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol* 2001;2(8):REVIEWS1023.

Walker SL, Lockwood DN. The clinical and immunological features of leprosy. *Br Med Bull* 2006;77-78:103-21.

Walsh GP, Meyers WM, Binford CH, Gerone PJ, Wolf RH, Leininger JR. Leprosy -a zoonosis. *Lepr Rev* 1981;52 Suppl 1:77-83.

Wemambu SN, Turk JL, Waters MF, Rees RJ. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the Arthus phenomenon. *Lancet* 1969;2(7627):933-5.

Williams DL, Pittman TL, Deshotel M, Oby-Robinson S, Smith I, Husson R. Molecular basis of the defective heat stress response in *Mycobacterium leprae*. *J Bacteriol* 2007;189(24):8818-27.

WHO. World Health Assembly Leprosy Resolution WHA 44.9, Forty-fourth World Health Assembly, May 13, 1991.

WHO World Health organization. Expert Committee on Leprosy. Technical report Series 1998; 874.

WHO. World Health Organization. Leprosy global situation. *Weekly Epidemiological Record* 2002; 77: 1-8.

WHO. World Health Organization. Leprosy global situation. *Weekly Epidemiological Record* 2012 87: 317-328.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 1992;149(4):1470-5.

Zodpey SP, Ambadekar NN, Thakur A. Effectiveness of *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) vaccination in the prevention of leprosy: a population-based case-control study in Yavatmal District, India. *Public Health* 2005;119(3):209-16.

ANEXO A
FICHA CLÍNICA

Registro N°.: _____

Nome: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: M () F () Cor: _____

Endereço: _____

Telefones: _____

Contato Intra domiciliar Sim () Não () Extra Domiciliar Sim () Não ()

HDA: _____

Descrição da placa: _____

Localização: _____ Dimensão: _____
Teste de sensibilidade: normal () alt. térmica: sim () não () alt. dolorosa: sim () não ()
alt. tátil: sim () não ()

Hipóteses Diagnósticas: _____

HPP: _____

Uso de Medicamentos: _____

Baciloscopia: _____ Mitsuda: _____ VDRL: _____

PCR : _____

Outros: _____

Evolução : _____

ANEXO B

FICHA DA HISTOPATOLOGIA

Biópsia: _____ data: _____

Biópsia: _____ data: _____

Congelação: _____

Epiderme:

Paraceratose () Espongiose () Acantose () Erosão da camada basal ()

Retificação dos cones interpapilares () Linfócitos intraepiteliais ()

Derme:

Composição do Infiltrado:

Linfócitos () Macrófagos () Plasmócitos () Neutrófilos () Eosinófilos ()

Cel. Epitelióides () Cel. Gig. de Langhans () Cel. Gig. Tipo corpo estranho ()

Outras: _____

Distribuição do Infiltrado:

Difusa () Focal () Cordonal () Perivascular () Perianexial () Perineural ()

Organização do Infiltrado:

Inespecífico () Granuloma Epitelióide () Granuloma Imaturo ()

Granuloma Sarcóidico () Granuloma tipo corpo estranho ()

Outros: _____

Filetes nervosos:

Preservados () Ausentes () Agredidos por infiltr. inespecífico ()

Agredidos por granuloma tuberculóide () Agredidos por granuloma ()

BAAR Pos () Neg () Necrobiose () Necrose da derme () Outros _____

ALTA PROBABILIDADE – Nervos agredidos pelo infiltrado e/ou BAAR positivo ()

MÉDIA PROBABILIDADE – Infiltrado inflamatório granulomatoso e nervos não identificados ()

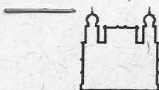

BAIXA PROBABILIDADE – Infiltrado inflamatório granulomatoso e nervos cutâneos preservados OU infiltrado inflamatório não granulomatoso e nervos cutâneos não identificados ()

OUTRAS DERMATOSIS () – aspectos histopatológicos de outras

dermatosis: _____

ANEXO C

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas</p> |  <p>I P E C</p> |
| <p>Comitê de Ética em Pesquisa</p> | |
| <p>PARECER CONSUBSTANCIADO – 020/2012</p> | |
| <p>CAAE 0059.0.009.000-11</p> | |
| <p>1. Identificação: Título do Projeto: "Diagnóstico da Hanseníase com Lesões Únicas em Placa". Pesquisador Responsável: Fernando Augusto Bozza. Mestranda: Raquel Rodrigues Barbieri. Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ. Data de Apresentação ao CEP: 15/12/2011.</p> | |
| <p>2. Sumário: Visa a descrever os aspectos clínicos e laboratoriais das lesões cutâneas únicas em placa em pacientes com suspeita de hanseníase. Tem como objetivos específicos: 1) Descrever os aspectos clínicos e epidemiológicos dos pacientes com lesão cutânea única em placa; 2) Descrever os aspectos microscópicos presentes nos fragmentos destas lesões; 3) Classificar estes pacientes qualitativamente de acordo com os achados histopatológicos de Ridley e Jopling em: alta, média e baixa probabilidade do diagnóstico de hanseníase; 4) Identificar material genético do <i>M. leprae</i> no tecido através da reação em cadeia da polimerase; 5) Verificar a relação entre os achados clínicos, epidemiológicos, histopatológicos e o resultado do PCR no tecido. Trata-se de estudo observacional retrospectivo e serão estudados os casos de portadores de lesão única em placa, com suspeita clínica de hanseníase. Os pacientes serão selecionados a partir do banco de dados do Ambulatório Souza Aguiar (ASA) da FioCruz, no período de janeiro de 2009 a junho de 2011. Os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais serão colhidos dos prontuários. Lâminas de amostras de pele coradas pela hematoxilina e eosina serão analisadas, e os achados microscópicos serão comparados com os parâmetros histopatológicos clássicos, estabelecidos por Ridley e Jopling em 1966, para o diagnóstico das formas TT e BT da hanseníase. Fragmentos de pele obtidos por biópsia e estocados em nitrogênio líquido serão utilizados para identificação de material genético do <i>M. leprae</i>, através da técnica de PCR em Tempo Real. Serão comparados os achados clínicos e epidemiológicos com os aspectos histopatológicos encontrados e os resultados do PCR, e verificar-se-á a associação entre eles.</p> | |
| <p>3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96). Projeto com delineamento adequado. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado em linguagem acessível ao sujeito de pesquisa. Por se tratar de uma pesquisa que utiliza dados que são coletos como rotina do atendimento do Ambulatório Souza Araújo e resultados de exames complementares da rotina do Laboratório de Hanseníase, o orçamento é anualmente previsto no POM do Laboratório.</p> | |
| <p>4. Diligências: Sim. Foram satisfeitas.</p> | |

"Diagnóstico da Hanseníase com Lesões Únicas em Placa"

Parecer: APROVADO.

Data: 13 de abril de 2012.

Assinatura do Coordenador:



Dr. Léa Camillo Costa
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPHC/FIOCRUZ

CAAE: 0059.0.0009.000-11

ANEXO D

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



Ministério da Saúde - Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ
Laboratório de Hanseníase – Ambulatório Souza Araújo

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

No início do meu tratamento no Ambulatório Souza Araújo, Laboratório de Hanseníase, IOC-FIOCRUZ estou sendo informado e esclarecido sobre questões importantes e necessárias, as quais estão relacionadas abaixo:

Aceito e entendo que:

Serei submetido a exames laboratoriais e demais procedimentos para confirmar a doença que fazem parte da rotina médica e são realizados de acordo com as normas do Programa de Controle da Hanseníase, determinado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Nenhum dos exames emite radiação ou apresenta contra-indicações para crianças e são realizados de acordo com rotinas padronizadas por pessoal capacitado e treinado para este fim.

Esses exames e procedimentos são: coleta de sangue, baciloscopia, teste cutâneo para avaliação da imunidade celular (Teste de Mitsuda), biópsia de pele, biópsia de nervo (sendo este último solicitado quando necessário para casos particulares) e aplicação da vacina BCG (para os contatos saudáveis dos pacientes).

As amostras coletadas de minha biópsia ou do meu sangue serão armazenadas, sem identificação nominal, de forma segura e em locais especialmente preparados para a conservação das mesmas.

Estou ciente e entendo que:

Fui informado sobre minha doença, modo de transmissão, meus direitos e deveres bem como sobre a necessidade dos familiares e contatos mais próximos indicados por mim, serem examinados. Fui informado também sobre os medicamentos a serem tomados e o tempo de tratamento, assim como da possibilidade da ocorrência de quadros reacionais.

Estou ciente de que:

Os procedimentos como biópsia de pele, coleta de sangue e baciloscopia, poderão ser novamente realizados durante o período de meu tratamento, caso apresente alguma intercorrência.

Estou ciente dos benefícios esperados

Pois, os procedimentos realizados trarão maior qualidade ao meu tratamento e acompanhamento. As informações coletadas são fundamentais para futuras análises que possam ampliar o conhecimento sobre a hanseníase, contribuindo para o avanço da ciência.

Estou ciente da forma de acompanhamento e assistência

Durante todo o meu tratamento serei acompanhando pela equipe médica do Ambulatório Souza Araújo e receberei os cuidados e orientações necessárias de enfermagem, assistência social e fisioterapia.

Estou ciente de que:

Se eu ou meus familiares tivermos alguma dúvida, poderemos procurar os profissionais do ambulatório Souza Araújo para esclarecimentos em relação ao tratamento, procedimentos e realização de pesquisas, pessoalmente ou através dos telefones 2562- 1594 ou 2562- 1571, de 2ª à 5ª feira, no horário de 9:00 às 16:00 horas

Enfermeira: Nádia Cristina Düppe
Médicos: Dr. Jose Augusto da Costa Nery
Dra. Anna Maria Sales
Dra. Márcia Maria Jardim Rodrigues
Assistente Social: Rita Maria de Oliveira Pereira

Todas as informações coletadas sobre meu estado de saúde serão mantidas em sigilo, preservando meu direito de privacidade.

Reafirmo que li e tenho pleno entendimento das informações recebidas e assim assino este termo de consentimento juntamente com o profissional responsável pela minha orientação.

Nome _____

Assinatura _____

Data ____ / ____ / ____

Responsável pela Orientação _____

Em caso de menores de 18 anos

Como responsável você autoriza (escreva o nome):

se tornar um participante do estudo descrito.

Nome do responsável _____

Assinatura do responsável _____