



7. Diagnóstico laboratorial da Hanseníase: indicações e limitações

Jaison A. Barreto

Introdução

Poucas doenças exemplificam tão bem o valor superior de uma boa anamnese, associado a um exame físico detalhado, como a hanseníase. Em aproximadamente 95% das vezes, há alterações de pele que podem ser detectadas por um profissional treinado, em uma sala bem iluminada, ou seja, onde entre iluminação solar. Estas lesões, entretanto, variam desde uma área de pele xerótica com perda de sensibilidade térmica e/ou dolorosa, sem alterações de cor ou infiltração, passando pelas famosas “manchas dormentes”, até nódulos de aspecto queloidiforme em uma pele aparentemente normal¹.

De uma maneira mais simples, para fins de tratamento, pode-se classificar a hanseníase em duas formas: as paucibacilares (PBs) e as multibacilares (MBs). As primeiras são aquelas onde os indivíduos afetados têm poucos bacilos, ou seja, não seriam transmissores, como nas formas indeterminadas (ou iniciais) e as tuberculoides polares (autolimitadas). Nas formas MBs (dimorfa e virchowiana), os indivíduos possuem uma carga bacilar maior, em virtude da incapacidade de seus sistemas imunes eliminarem os micro-organismos; seriam, portanto, transmissores em potencial. Assim, normalmente os pacientes com hanseníase PB têm poucas lesões de pele, raramente afetando troncos nervosos; já os MBs têm muitas lesões e acometimento extenso de nervos².

O conceito de polaridade da hanseníase, desenvolvido por Rabelo na primeira metade do século XX, culminou na Classificação de Madrid (1953). Esta classificação deu origem à Classificação de Ridley & Jopling (R&J)², desenvolvida em 1962, modificada em 1966, e revisada por Ridley em 1971, onde foi denominada “Cinco de Sete Grupos”; esta última é utilizada em pesquisas até os dias de hoje (quadro 1). Por esta classificação, que denomina a forma indeterminada de “Lepra precoce”, um portador da doença pode estar dentro da faixa tuberculoide, dimorfa ou virchowiana, de acordo com seus aspectos clínicos, histopatológicos, baciloscópicos, imunológicos e evolutivos³. Os indivíduos com hanseníase tuberculoide (T) dividem-se em dois grupos: os polares (TT) e os tuberculoides de baixa resistência (TI ou TR). Os dimorfos (D), também chamados *borderlines* (B) na literatura inglesa, podem ser subclassificados em 3 subgrupos: DT (ou BT), DD (ou BB) e os DV (ou BL). Por último, os virchowianos (V), também chamados lepromatosos (L) na literatura inglesa, podem ser divididos em virchowianos polares (LLp) e subpolares (LLsp ou LI)¹.

Quadro 1: Classificação de Ridley, Cinco de Sete Grupos (1971).

Forma clínica	TTp	TI/TR	BT	BB	BL	LI/LLsp	LLp
Mitsuda	+++	++	+	-	-	-	-
Estabilidade imunológica	++	+	+/-	-	+	-	++
Reação tipo 1	-	+/-	+	++	+	+/-	-
Reação tipo 2	-	-	-	-	-	+	+
Bacilos na mucosa nasal	-	-	-	-	+	++	++
Bacilos no granuloma	-	0/1+	1/2/3+	3/4+	4/5+	5/6+	5/6+
Células epitelioides	+	+	+	+	-	-	-
Linfócitos	+++	+++	++	+	+++	+	+/-
Globias	-	-	-	-	-	+	+
Macrófagos xantomizados	-	-	-	-	+	++	+++
Erosão da epiderme	+	+/-	-	-	-	-	-
Infiltração subepitelial	+	+	+/-	-	-	-	-
Destrução de nervos dérmicos	++	+++	++	+	+/-	+/-	-

Fonte: Hastings RC, 2. edição, 1994, p. 187.

Todavia, por conta da impossibilidade de se ter, em campo, todas as ferramentas para esta classificação tão precisa, muita confusão até hoje existe. Na faixa tuberculoide, ou seja, TT, TR e BT, além dos quadros de reação reversa, os achados histopatológicos são muito semelhantes, e por vezes, indistinguíveis⁴. Da mesma forma, muitos casos classificados inicialmente como virchowianos podem ser, realmente, LLp, LLsp ou BL. Também há, na prática, muita dificuldade em se distinguir, histopatologicamente, os BB dos BL, embora os primeiros tenham um infiltrado linfocitário mais intenso⁵.

Segundo Ridley, a maioria dos pacientes com hanseníase “tuberculoide” seria, na verdade, BT; da mesma forma, grande parte dos “virchowianos” se originaria de dimorfos não diagnosticados inicialmente, que perderam a batalha contra o bacilo, tomando evolutivamente a forma de indivíduos anérgicos⁶. Esta perda progressiva de resposta imunológica frente a um agente atóxico, como o *Mycobacterium leprae*, é hoje conhecida como “Teoria da Deleção Clonal”, descrita por Starlz & Zinkernagel em 1998⁷. Como em

qualquer distribuição de normalidade, 95% dos indivíduos estão dentro de dois desvios padrões, ou seja, significa que os extremos são incomuns. Em especial, no caso da hanseníase, doença de evolução longa e indolente, que afeta indivíduos social e culturalmente desfavorecidos, segundo dados do Ministério da Saúde, em 70% dos casos. Assim, é especialmente lógico esperar-se que formas TT (autolimitadas e assintomáticas), bem como formas LLp (sintomas escassos e não limitantes fisicamente), sejam incomuns⁶.

Considerações sobre o diagnóstico clínico e laboratorial

Como explicitado acima, para um profissional experiente, o diagnóstico da forma clínica de hanseníase pode ser realizado, na maioria das vezes, com alto grau de acurácia, após uma boa história clínica e epidemiológica e um bom exame dermatoneurológico. Em alguns casos, como quando há lesões maculares hipocrômicas, a prova da histamina é útil, uma vez que é sempre incompleta. Algumas dúvidas sobre o diagnóstico, entretanto, podem ocorrer diante de casos dimorfos iniciais; estes muitas vezes só vão apresentar sua verdadeira morfologia após o início ou término da poliquimioterapia (PQT). Nestes casos, a baciloscopia da(s) lesão(ões) mais infiltrada(s) e de pontos índices, ou mais raramente, devido à indisponibilidade, a biópsia da borda de uma lesão infiltrada, pode já prevenir a subclassificação de um caso MB como PB⁸.

Excetuando-se os LLp, que podem não apresentar lesões visíveis, mas onde a baciloscopia é sempre positiva em pontos índices, e os dimorfos iniciais descritos acima, via de regra, indivíduos com múltiplas lesões teriam imunidade celular insuficiente para conter a disseminação bacilar por via hematogênica, ao menos em uma fase inicial. Assim, pacientes com múltiplas lesões deveriam, portanto, ser classificados, para fins de tratamento, como MBs, atuais ou em potencial. Da mesma forma, pacientes com comprometimento de múltiplos troncos nervosos, independentemente do comprometimento tegumentar, teriam também esta mesma deficiência imunológica, devendo ser classificados também como MBs, embora a baciloscopia do esfregaço ou da biópsia de pele resulte negativa em alguns deles⁹.

Pela classificação baseada no número de lesões, utilizada atualmente, indivíduos dimorfos com múltiplas lesões reacionais de aparecimento abrupto (antes do tratamento específico) são classificados como MBs. Entretanto, se houver menos de 6 lesões inicialmente, e a reação só ocorrer após o início da PQT, ou mesmo do seu término, são classificados e tratados erroneamente como PBs⁸. Dentre estes indivíduos, que geralmente são BT, a evolução frequentemente é desfavorável quando subtratados, com reações recorrentes, córtico-dependentes, culminando em “recidiva” após 7 a 10 anos, em média.

Em relação à hanseníase neural primária (HNP), também conhecida como neural pura, correspondente a 5% dos casos, o diagnóstico baseia-se em uma série de critérios clínicos, epidemiológicos, histopatológicos, microbiológicos, imunológicos e eletroneuromiográficos, descritos de forma detalhada e recente no Programa Diretrizes, da Associação Médica Brasileira¹⁰.

Baciloscopia: coleta de material e coloração

Tendo-se sempre em conta que a baciloscopia ou biópsia de pele, mesmo se negativas, não afastam o diagnóstico⁸, somente ao persistir a dúvida se o caso em questão é de hanseníase MB, cumpre realizar a baciloscopia. Considerada procedimento minimamente invasivo, pode ser coletada por qualquer profissional de nível técnico. Este procedimento não oferece risco de transmissão por via aérea (aerosol). Para isso, são necessárias as seguintes ferramentas:

- cabo de bisturi número 3;
- lâmina de bisturi estéril número 15;
- lâmina de vidro nova, previamente desengordurada, com extremidade fosca para identificação;
- lápis preto HB número 2;
- caneta para marcar vidro;
- luvas de procedimento;
- álcool 70%;
- algodão hidrófilo;
- esparadrapo;
- pinça Kelly de 14cm;
- borracha de garrote de soro;
- caixa de fósforos ou isqueiro;
- invólucro para proteção da lâmina de vidro (plástico ou papel próprio).

Após cuidadoso exame físico do paciente, seleciona-se a(s) área(s) de coleta, preferencialmente lesões, escolhendo-se as mais infiltradas e sempre nas bordas. Caso a lesão seja um nódulo, coleta-se no centro, embora nestes casos a baciloscopia de pontos índices também seja positiva (hanseníase virchowiana). Por motivos óbvios, para fins diagnósticos, não se coleta material de lesões reacionais, já que o diagnóstico de hanseníase MB normalmente já está confirmado por meio da avaliação clínica, a qual, geralmente, demonstrará presença de neurite associada.

A técnica correta consiste nas seguintes etapas: marcam-se 4 círculos no verso da lâmina de vidro para orientação da colocação dos esfregaços. Identifica-se, em formulário próprio, os locais de coleta respectivos. Após a lavagem de mãos, calça-se as luvas, faz-se a antisepsia dos locais de coleta com álcool 70%. A isquemia do local da coleta pode ser feita por meio de pinçamento digital, distensão manual da pele, ou com auxílio da pinça, cujas pontas devem estar revestidas com a borracha de garrote (Foto 1). Com o bisturi, introduz-se o fio da lâmina até atingir o derma reticular superficial (2 a 3mm), o que gera uma incisão de 5 a 7mm de comprimento. Com a parte não cortante do bisturi, cureta-se o fundo da incisão para coleta das células parasitadas (Foto 2). Semeia-se na lâmina de vidro, espera-se secar ao ar ambiente por 10 a 15 minutos. Fixa-se em algodão totalmente

embebido em álcool 70% por 6 segundos, passando-se a parte inferior da lâmina sobre a chama. O material então está pronto para ser corado. Se a lâmina não for corada imediatamente, recomenda-se guardá-la em frasco próprio, ao abrigo da luz, sujeira e calor, por no máximo 1 semana.

Quanto à coloração, em virtude da menor álcool-ácido-resistência da parede celular do *M. leprae*, deve-se utilizar fucsina fenicada de Ziehl a 1%, corando-se pelo método a frio (nunca a quente, como na tuberculose) por 20 minutos. Deve-se filtrar a fucsina sempre em papel filtro, sobre a lâmina, na hora da coloração, sob pena de haver depósito de cristais do corante, que podem ser interpretados erroneamente como bacilos íntegros. Escorre-se o excesso, e descora-se com álcool-ácido a 1% (nunca a 3%, como na tuberculose) por no máximo 10 segundos. Lava-se gentilmente em água para parar o processo. Contracora-se com azul de metileno 0,3% por 2 minutos. Espera-se secar ao ar ambiente para leitura em microscópio ótico em aumento 1000x. Para a quantificação de bacilos, utiliza-se a Escala Logarítmica de Ridley, que varia de zero a seis cruzeiros¹¹. O Índice Baciloscópico (IB) será obtido pela média dos 4 campos. Se possível, o Índice Morfológico (IM) também deverá ser fornecido; este é obtido pela razão entre o número de bacilos aparentemente íntegros e o total.

Histopatologia

Embora considerado o método mais sensível e específico para o diagnóstico de todas as doenças causadas por parasitas intracelulares obrigatórios, o exame anatomopatológico é caro, demorado e ainda pode gerar resultados falso-negativos por conta de três fatores: qualidade do material enviado e da histotécnica, representatividade da amostra e experiência do profissional avaliador. Não incomumente, material de biópsia de pele chega aos laboratórios mal fixado, esmagado ou sem informações que permitam ao patologista um diagnóstico acurado. Biópsia de lesão regressiva, ou do centro da lesão, também pode gerar um resultado incompatível com o diagnóstico correto. Particularmente nos casos de hanseníase com comprometimento preferencialmente neural, principalmente nos BT, pode haver baciloscopia rica dentro dos nervos e ausente ou escassa na pele⁹.

Quando, então, deve ser solicitada a biópsia de pele? Em linhas gerais, nos seguintes casos:

- quando não há possibilidade de avaliação adequada da sensibilidade cutânea, como em deficientes mentais e crianças, por exemplo;
- para diferenciar quadros dimorfos iniciais de hanseníase indeterminada ou tuberculoide;
- nos casos em que há dúvida entre hanseníase e outras doenças que cursam com hipoestesia local, como esclerodermia, necrobiose lipoídica e meralgia/otalgia parestésica;
- nos pacientes que não querem se submeter à baciloscopia.

O espécime deve ser coletado pelo profissional médico apenas, e todos os materiais, bem como a técnica, utilizados no procedimento, deve ser estéril. Após cuidadoso exame dermatoneurológico, o(s) local(is) selecionado(s) deve(m) ser anestesiado(s) com xilocaína com epinefrina, com exceção de dedos ou pênis, onde não se utiliza vasoconstritor associado. Este tipo de anestésico, quando a biópsia é realizada com o auxílio de um punch número 5, dispensa a necessidade de sutura hemostática, com exceção de face e membros inferiores, onde o sangramento normalmente é mais profuso¹².

Se não houver disponibilidade de um punch número 5, pode ser realizada a biópsia em fuso por meio de bisturi, com pelo menos 5mm de largura por 1cm de comprimento, onde o tecido celular subcutâneo deve estar presente. Evitar lesões ulceradas ou com infecção secundária, que podem mascarar um quadro subjacente de hanseníase. Jamais pinçar o material, para evitar artefatos de esmagamento; na pior das hipóteses, admite-se a transfixação com agulha ou gancho. Colocar o material coletado em solução de formalina 10%, se possível formol tamponado. Jamais utilizar formol puro (formalina 37 a 40%), pois esta solução é muito ácida, causa ultrafixação, resseca o material e inviabiliza colorações especiais. Após homogeneização da solução saturada de formalina, obtida normalmente pelo aquecimento em banho-maria, deve-se diluir uma parte deste formol puro em 9 partes de água limpa, obtendo-se assim formol a 10%. Este último pode ser utilizado para biópsias de pele, ou até mesmo de nervos. A quantidade de formol a 10% deve ser de 5 a 10 vezes o volume da peça, ou seja, cerca de 5 a 10ml. O frasco a ser utilizado deve impedir o vazamento do formol, ou seja, deve ser preferencialmente de vidro com tampa de borracha, vedado com esparadrapo, e cada fragmento deve ser colocado em frasco isolado e identificado com o local da coleta. Os seguintes dados devem estar presentes na requisição: hipóteses clínicas; tempo de doença; número, forma (área de pele, máculas, placas, nódulos) e modo de aparecimento das lesões, se o paciente já tratou ou não e há quanto tempo¹².

Lembrar sempre que os resultados de qualquer exame laboratorial devem ser correlacionados com a clínica. Os resultados devem ser informados de acordo com a classificação de R&J, embora lesões regressivas possam ser laudadas como compatíveis com hanseníase MB ou PB. Biópsias de ramos nervosos superficiais, raramente necessárias, devem ser feitas em centros de referência e em último caso, conforme as Diretrizes da AMB para diagnóstico de HNP¹⁰.

Reação de Mitsuda e Sorologia

A reação de Mitsuda, cujo antígeno é a mitsudina, é um preparado obtido a partir de hansenomas de pacientes virchowianos não tratados. O antígeno de Mitsuda é fabricado e fornecido por alguns centros de referência, e sua disponibilização é crucialmente dependente de material enviado para estes centros. Por este motivo, geralmente não é de fácil obtenção pela rede básica, ou mesmo centros de referência. Possui forte correlação negativa com a sorologia, e esta última apresenta forte correlação positiva com a baciloscopia. Indivíduos com reação de Mitsuda cujo diâmetro é maior que 10mm, ou ulcerada, são geralmente resistentes ao bacilo, e não adoecem, ou no máximo desenvolvem a forma TT, autolimitada. Quando a reação é maior que 5 e menor que 10mm, normalmente indica formas que cursam com rea-

ções tipo 1 (BT e TR). Entre 3 e 5mm, são indicativas de hanseníase dimorfa, e abaixo disso indicam anergia virtual ao bacilo, ou seja, indivíduos na faixa virchowiana².

A reação de Mitsuda, portanto, não serve para diagnóstico, mas sim para prognóstico. Segundo Bechelli, as crianças nascem com reação de Mitsuda negativa, mas a maioria delas é positiva até os 10 anos. A vacinação BCG pode abreviar esta conversão, porém não modifica a resposta já formada, ou seja, um dimorfo jamais terá um Mitsuda fortemente reator, nem um virchowiano apresentará conversão após ser vacinado¹³. Assim, a “proteção” pela vacinação com BCG talvez só ocorra em pacientes BT, ou nas formas indeterminadas que evoluiriam naturalmente para TT⁶.

A sorologia para hanseníase já é conhecida desde a década de 1980, quando foi descoberta a parte mais imunológica e específica da parede celular do bacilo, do ponto de vista humoral: o glicolípido fenólico 1, ou PGL1. Níveis altos de IgM anti-PGL1 indicam doença MB não tratada ou recente, ou exposição intensa e recente ao *M. leprae*, com alto risco de adoecimento. A sorologia também é útil em indivíduos neurais puros MB, mas a técnica falha em detectar indivíduos PB ou alguns dimorfos recentes¹⁴. Mais recentemente, um teste rápido foi desenvolvido para ser utilizado em campo, denominado ML-Flow, que posteriormente foi sensibilizado pela adição de outro antígeno, chamado LID1. O teste atual possui aproximadamente 95% de sensibilidade para formas MBs, mas ainda assim falha em detectar indivíduos com hanseníase indeterminada e TT. Estes testes rápidos estão sendo testados em campo e deverão ser disponibilizados em breve.

Avanços e desafios sobre o diagnóstico e tratamento da hanseníase

Quando a efetiva implantação da PQT ocorreu no Brasil, no início da década de 1990, houve muita resistência, por conta de hansenologistas de renome, em admitir a possibilidade de cura de uma doença até então considerada crônica. O problema maior era indicar, com segurança, quais os pacientes deveriam receber o esquema PB. Em princípio, este esquema de monoterapia diária com dapsona acrescido de rifampicina, uma vez por mês, deveria ser reservado apenas para os indivíduos TT, bem como para os indeterminados com reação de Mitsuda positiva, que tendem a se curar espontaneamente. Como o antígeno de Mitsuda, assim como a baciloscopia e biópsia são normalmente indisponíveis em campo, e a maioria dos indivíduos doentes pertence ao grupo dimorfo, que tem algum grau de imunidade celular, admitiu-se que todos os indeterminados poderiam ser tratados com o mesmo esquema (PB). Alguns especialistas, entretanto, postulavam que o esquema deveria ser único, ou seja, esquema MB por 1 ano para todos os casos, podendo ser estendido para os indivíduos virchowianos muito avançados.

Hoje, sabe-se que a maioria dos casos MB, que são dimorfos, pode ser curada após 1 ano de PQT. Em alguns casos virchowianos, o tratamento deve ser estendido por 2 anos, já que a taxa de resistência múltipla a drogas é baixa. Em estudo recente realizado em área endêmica do Brasil, com quase 2000 pacientes tratados com PQT e seguidos por até 10 anos, a taxa de recidiva em pacientes tratados com PQT MB foi menor que 2%. Dentre

os indivíduos que recidivaram, metade deles era formada por pacientes que receberam o diagnóstico de hanseníase TT, foram tratados com PQT PB, mas na evolução observou-se que eram, de fato, BTs, ou seja, deveriam ter sido tratados como MBs.

Como na tuberculose, uma alternativa prática seria se adotar um esquema único MB de 1 ano para todos os pacientes, já que os TT e indeterminados são raros na prática diária. Isto tornaria desnecessária a realização de baciloscopia, uma vez confirmado o diagnóstico clínico. Considerando-se que a dapsona é a principal droga associada a reações graves aos medicamentos da PQT, que estas reações ocorrem quase sempre no início do tratamento, e que a clofazimina possui, além de atividade antibacteriana, ação anti-inflamatória, a única “contraindicação” de tal esquema único seria o aumento da prevalência. Entretanto, as taxas de cura, certamente, seriam muito mais aceitáveis que as atuais, uma vez que as recidivas, na maioria das vezes, devem-se aos tratamentos insuficientes de pacientes dimorfos com esquemas PB.

Figuras 1, 2 e 3: Coleta de baciloscopia de lesões e de pontos índices: onde não há possibilidade de se utilizar a pinça, deve-se fazer o pinçamento digital, ou distensão da lesão. Se houver inexperiência, orienta-se utilizar a pinça protegida por borracha de garrote de soro.



Figura 1



Figura 2



Figura 3

Figuras 4 e 5: O material curetado das lesões deve ser colocado em uma lâmina previamente marcada. Espera-se secar ao ar ambiente, e em seguida, passa-se na chama de um algodão embebido em álcool 70% por 6 segundos. O material assim obtido pode ser facilmente corado e lido.

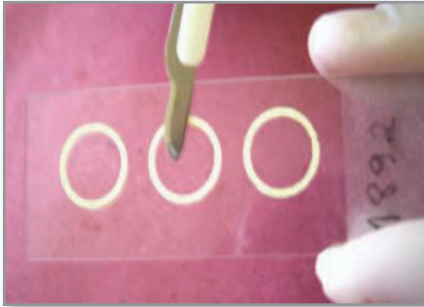


Figura 4

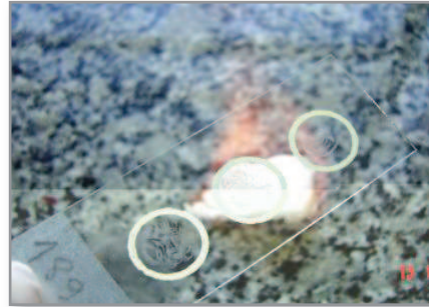


Figura 5

Referências

- 1 - Dharmendra. Classifications of leprosy. In: Hastings, RC, editor. *Leprosy*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994.
- 2 - Opromolla DVAO, editor. *Noções de Hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato; 2000.
- 3 - 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.
- 4 - Fleury RN. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley & Jopling – uma análise morfológica. *Hansenol Int*. 1989; 14(2):101-8.
- 5 - Ridley DS. *La biópsia de piel en la lepra*. 2nd ed. Suíça: CIBA:GEIGY; 1987.
- 6 - Ridley DS. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. *Bull World Health Organ* 1974; 5(5):451-65.
- 7 - Starzl TE, Zinkernagel RM. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *N Engl J Med*. 1998; 339(26):1905-13.
- 8 - Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde; 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_n_3125_hanseniaze_2010.pdf.
- 9 - Barreto JA, Carvalho CV, Cury Filho M, Garbino JA, Nogueira MES, Soares CT. Hanseníase multibacilar com baciloscopia dos esfregaços negativa: a importância de se avaliar todos os critérios antes de se definir a forma clínica. *Hansenol Int*. 2007; 32(1):75-9.
- 10 - Garbino JA, Marques W Jr, Barreto JA, Heise CO, Rodrigues MM, Antunes SL, Soares CT, Floriano MC, Nery JA, Trindade MA, Carvalho NB, Andrada NC, Barreira AA, Virmond MCL. Primary Neural Leprosy: Systematic Review. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013 Jun;71(6):397-404.
- 11 - Leiker DL, McDougall AC. *Guia técnico baciloscopia da hanseníase*. 2nd ed. Wurzburg: DAHW; 1987.
- 12 - Ura S, Barreto JA. Papel da biópsia cutânea no diagnóstico de hanseníase. *Hansenol Int*. 2004; 29(2):141-4.
- 13 - Arruda MS, Fleury RN, Nogueira ME, Ura S, Arruda OS. Assessment of the Mitsuda reaction in lepromatous patients inactive before and after immunotherapy. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1995 Jul-Sep;28(3):233-6.
- 14 - Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Buhner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(Suppl.2):11-8.
- 15 - Hastings RC, editor. *Leprosy*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994.