

Artigo original

Hanseníase e laboratório: uma interação desafiadora *Leprosy and the laboratory: a challenging interaction*

Heloisa da Silveira Paro Pedro^I; Susilene Maria Tonelli Nardi^I; Fernanda Modesto Tolentino^I; Emilaine Ribeiro de Carvalho^I; Janaína Olher Martins Montanha^I; Marcus Alexandre Mendes Luz^{II}; Vania Del'Arco Paschoal^{II}

^IInstituto Adolfo Lutz – Centro de Laboratórios Regionais de São José do Rio Preto.

^{II}Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo – Brasil.

RESUMO

O *M. leprae* é o agente da hanseníase. Por ser um bacilo não cultivável em meios definidos, seu diagnóstico é essencialmente clínico. Pesquisas têm sido realizadas para desenvolver novas ferramentas de diagnóstico e consequente detecção precoce da doença. O objetivo deste trabalho é investigar e apresentar o que há de atual nas pesquisas em relação ao diagnóstico laboratorial da hanseníase. Foi realizada revisão bibliográfica, que utilizou 57 artigos provindos da MEDLINE, PUBMED, LILACS, SciELO, PAHO e WHOLIS, com os unitermos: diagnóstico, hanseníase, *Mycobacterium leprae*, PGL-I, biópsia, diagnóstico molecular, PCR, sorologia e transmissão. Foi constatado que exames auxiliam no diagnóstico diferencial, mas não há um exame considerado padrão-ouro. Os testes clássicos como baciloscopia, biópsia e Mitsuda continuam sendo utilizados. O sorodiagnóstico, baseado na detecção de anticorpos IgM ao glicolípido fenólico I (PGLI), foi explorado e vários testes desenvolvidos para diagnóstico. As técnicas moleculares que utilizam genes específicos do *M. leprae* como alvo são utilizadas para auxiliar em casos difíceis e são consideradas técnicas promissoras pela alta sensibilidade e especificidade, mas a maioria, ainda restritas à pesquisa, devido ao alto custo que inviabiliza sua utilização na rotina laboratorial. Novos métodos estão sendo testados, mas ainda são inviáveis pela tecnologia sofisticada e custo elevado ou por oferecerem valor prognóstico e não diagnóstico.

PALAVRAS-CHAVE: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. Diagnóstico laboratorial.

ABSTRACT

Mycobacterium leprae is the etiologic agent of leprosy. As the bacillus cannot be cultivated in artificial media, leprosy diagnosis is essentially clinical. Studies have been performed to develop new diagnostic tools for early disease detection. The objective was report the current research status regarding the laboratory diagnosis of leprosy. Search in the databases MEDLINE, PUBMED, LILACS, SciELO, PAHO and WHOLIS included 57 articles using the keywords: diagnosis, leprosy, *Mycobacterium leprae*, PGL-I, biopsy, molecular diagnosis, PCR, serology and transmission. Tests help in the differential diagnosis, however none of the exams is considered gold standard; the classical slit skin smear, biopsy and Mitsuda tests continue to be used. Serodiagnosis, based on the detection of IgM antibodies against phenolic glycolipid I (PGLI), has been used in several diagnostic tests. Molecular techniques targeting *M. leprae* specific genes have been employed for difficult cases and are considered promising techniques due to their high sensitivity and specificity. However, because of their high cost they are used mostly for research purposes. New methods are being tested but they remain infeasible to be used in the routine diagnosis, either because of their cost and sophisticated setup needed, or because they aim mostly at prognosis of leprosy.

KEYWORDS: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Laboratory diagnosis.

INTRODUÇÃO

Hanseníase é uma doença infectocontagiosa, de evolução lenta, que se manifesta por meio de sinais e sintomas dermatoneurológicos.¹ É considerada um problema de saúde pública por apresentar alto poder incapacitante, decorrente dos processos patológicos e imunológicos que ocorrem diretamente nos nervos periféricos. Os acometimentos neurais podem evoluir para deficiências físicas permanentes, em especial nos olhos, nariz, mãos e pés, além de repercussões sociais e psicológicas, que contribuem significativamente para a sua morbidade.^{2,3} No entanto, em países desenvolvidos, ela foi eliminada e é curável, se tratada.⁴

No ano de 2012, foram diagnosticados no Brasil 33.303 novos casos,⁵ distribuídos de forma heterogênea devido à grande variação do coeficiente de prevalência nas várias regiões do país, o que classifica o Brasil em segundo lugar em número absoluto de casos no cenário mundial.^{6,7}

Apesar de ser uma doença milenar, o fato do *Mycobacterium leprae* não ser cultivável dificulta o entendimento sobre a transmissão, suscetibilidade e acometimento neural.⁸

Muitos estudos utilizando biomarcadores moleculares e imunológicos para o desenvolvimento de técnicas laboratoriais mais seguras e confiáveis quanto à especificidade e

sensibilidade para detecção do *M. leprae* têm sido conduzidos em todo o mundo. Porém, nenhuma técnica oferece ainda resultados com valores efetivos para o diagnóstico, sendo este essencialmente clínico, e os exames laboratoriais apenas colaboram com o diagnóstico.⁹

Para suprir a carência do suporte laboratorial, a Organização Mundial de Saúde recomendou desde 2000, e o Ministério da Saúde do Brasil adotou a partir de 2002, um método simplificado para a classificação da hanseníase, para fins de tratamento, baseado na contagem do número de lesões cutâneas, a qual é necessária para alocação correta do paciente nos dois esquemas terapêuticos existentes, e assim garantir um tratamento eficaz.^{10,2}

Este estudo teve como objetivo investigar e apresentar o que há de atual nas pesquisas em relação ao diagnóstico laboratorial da hanseníase.

METODOLOGIA

A abordagem metodológica empregou como instrumento a pesquisa exploratória de caráter bibliográfico, no período de 1966 a 2013, utilizando como base de dados MEDLINE, PUBMED, LILACS, SciELO, Organização Pan-americana de Saúde (PAHO), Sistema de Informação da Biblioteca da OMS (WHOLIS). Os unitermos selecionados para a pesquisa, associados ou não, foram: diagnóstico; hanseníase; *Mycobacterium leprae*; PGL-I; biópsia; diagnóstico molecular; PCR; sorologia e transmissão.

O processo de busca resultou na inclusão de 57 artigos, leis, portarias, teses, monografias e demais investigações baseadas em evidências científicas e/ou de caráter investigativo epidemiológico/operacional. Livros, artigos

e outros documentos impressos fizeram parte da metodologia com propósito de sustentar teoricamente esta revisão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Agente Etiológico

O agente etiológico da hanseníase, o *Mycobacterium leprae*, identificado em 1873, foi considerado o primeiro micro-organismo patógeno a ser associado com uma doença em humanos.⁴ É um bacilo gram-positivo, que apresenta parede celular com elevado teor de lipídios estruturais, os quais provocam forte hidrofobicidade, dificultando a ação dos diferenciadores de corantes aquosos, conferindo a característica de bacilo álcool-ácido resistentes (BAAR). Desta forma, na coloração de Ziehl-Neelsen,^{11,2} os bacilos isolados ou em globias¹² coram-se pela fuccina e não descoram-se pelos ácidos e álcoois.

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, com tropismo por fagócitos, como macrófagos teciduais e células dendríticas e as células de Schwann de nervos periféricos humanos e outros tipos celulares como células epiteliais, endoteliais e fibroblastos. Acomete ainda mucosas, olhos, medula óssea, vísceras abdominais, linfonodos e testículos.¹³

O *Mycobacterium leprae* depende de produtos metabólicos do hospedeiro para sua replicação, o que poderia explicar seu longo período de incubação e sua incapacidade de multiplicação em meios de cultura artificiais.² Esses fatores implicaram em grandes dificuldades nas pesquisas para produção de testes diagnósticos, no período que precedeu o conhecimento do genoma da bactéria.¹⁴

Patologia

A característica principal da doença é o comprometimento dos nervos periféricos. O mecanismo utilizado pelo *M. leprae* para os invadir ainda não é totalmente conhecido. Porém, uma vez dentro do nervo, o bacilo desencadeia alterações patológicas como desmielinização, degeneração axonal e fibrose aumentada.^{15,16}

No Brasil, segundo Araujo,¹⁷ as classificações de Madri e de Ridley e Jopling são as mais utilizadas. A primeira preconiza dois polos estáveis e opostos (virchoviano e tuberculoide) e dois grupos instáveis (indeterminado e dimorfo) que caminham para um dos polos na evolução da doença. Ridley e Jopling propuseram a classificação baseada na imunidade do hospedeiro.¹⁸

Transmissão

As vias aéreas superiores são as principais vias de eliminação e infecção do indivíduo pelo bacilo de Hansen, no entanto, há a possibilidade do indivíduo doente e não tratado eliminar bacilos por meio de lesões da pele, podendo transmiti-lo a indivíduos sadios que não estejam com a pele íntegra.¹⁹

Pacientes com a forma multibacilar, que não iniciaram o tratamento medicamentoso, são considerados fontes de transmissão, devido à eliminação dos bacilos pelas vias aéreas superiores. Os contatos domiciliares de pessoas com hanseníase apresentam significativamente um risco maior de desenvolver a doença do que a população em geral.²⁰

Estudos moleculares, em populações de áreas endêmicas para hanseníase, têm evidenciado a presença de DNA de *M. leprae* na mucosa nasal de indivíduos saudáveis. Este fato mostra

evidências de carreadores temporários, em que pessoas infectadas podem passar por um período de excreção nasal, aventando a possibilidade de ocorrer transmissão pelos portadores sãos e por aqueles com infecção subclínica.²¹

A ideia de que o ser humano era a única fonte de infecção do bacilo foi sustentada até a primeira metade do século XX, porém nos anos de 1960 e, posteriormente, em 1971, ela foi contestada ao observar que esta bactéria tinha capacidade de infectar e se multiplicar em alguns animais, como em coxim de pata de camundongos e em tatus (*Dasypus novemcinctus*).²² Estes últimos, como o homem, também são reservatórios naturais do bacilo, possibilitando um melhor embasamento para estudos bacteriológicos.¹⁵

A partir disso, a possibilidade de novas fontes de infecção pelo bacilo de Hansen tem sido apresentada em outros estudos. Uma possível fonte de infecção do *M. leprae* pelo consumo da carne de tatu, principalmente nas pessoas com hanseníase sem história de contatos com outros pacientes antes do seu diagnóstico, foi descrita por Deps e colaboradores.²³

Mais recentemente, em um estudo ainda experimental, foi aventada a possibilidade de o barbeiro agir como vetor do bacilo, por demonstrar que este pode infectar-se ao fazer seu repasto sanguíneo.²⁴

TESTES LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO DA HANSENÍASE

O laboratório tem a missão de produzir resultados de exames que sejam úteis e com qualidade assegurada para o diagnóstico das doenças de saúde pública. Importante também é o investimento para o desenvolvimento de

novos métodos laboratoriais e melhoria de testes existentes, fatores determinantes para tentar atingir as metas da OMS, em relação à doença, programadas para o período de 2011-2015.^{25,19}

O exame clínico dermatoneurológico e a baciloscopia positiva ainda são considerados soberanos para a definição do diagnóstico da hanseníase, no entanto, testes sorológicos e moleculares têm sido apresentados como importantes ferramentas complementares que podem auxiliar no diagnóstico diferencial e classificação da hanseníase.^{26,4,17}

Baciloscopia

O exame complementar mais utilizado no diagnóstico é a baciloscopia com raspado de tecido dérmico ou linfa dos lóbulos das orelhas direita e esquerda, cotovelo direito e esquerdo e lesão suspeita. A coloração é feita pelo método de Ziehl-Neelsen e o resultado liberado é baseado em uma escala logarítmica que vai de 0 a 6+, proposto por Ridley em 1962.¹⁹

Embora a baciloscopia auxilie no diagnóstico da doença, apresenta baixa sensibilidade, sendo negativa nas formas paucibacilares e pode apresentar também negatividade em alguns pacientes multibacilares devido a procedimentos inadequados de coleta, coloração, leitura, e pelo fato de que nem sempre o bacilo é evidenciado nos sítios de coleta.^{27,19} Há dificuldades em relação a sua padronização devido à quantidade do tecido removido, espessura do esfregaço e profundidade do corte.²⁷

Apesar disso, o exame é considerado, ainda hoje, como o único instrumento rápido e de baixo custo para a confirmação de casos MB atípicos, apresentando boa acurácia para classificar a forma clínica da doença e colaborar na escolha

do esquema de tratamento. Suas vantagens, desvantagens e limitações são discutíveis.²⁵

Biópsia

A biópsia tem papel de grande relevância quando não há condições de se fazer o diagnóstico diferencial da hanseníase e os procedimentos clínicos não são elucidativos, assim como os testes de sensibilidade se mostram inconclusivos por serem realizados em crianças, idosos e portadores de doença mental, entre outros.²⁸

Em casos suspeitos de hanseníase tuberculoide a biópsia é necessária porque a visualização dos bacilos é difícil e nem sempre as alterações da sensibilidade e a avaliação dos troncos nervosos possibilitam diagnosticar a doença. A biópsia também pode ser útil para diagnóstico diferencial entre reação reversa e recidiva.²

O diagnóstico histopatológico obtido a partir de uma biópsia representa uma significativa ferramenta na investigação da hanseníase, estabelecendo bases para a determinação de um diagnóstico confiável e que permita a classificação das lesões dentro da escala de Ridley-Jopling,²⁹ mesmo em alguns casos em que a manifestação clínica da doença seja discreta.

Pinquier³⁰ afirma que a utilização e o valor da contribuição do exame histopatológico dependem de fatores como o grande polimorfismo clínico e histológico associados ao estado imunológico e ao desenvolvimento da imunidade celular do paciente. A classificação das formas tuberculoide e virchoviana baseia-se, na microscopia, na presença de granuloma linfocitário na primeira forma e na presença de macrófagos de Virchow (células espumosas) associadas a poucos linfócitos na segunda forma.

As formas intermediárias podem, de acordo com Shivaswamy et al.,³¹ apresentar sobreposição dessas tipologias, resultando em 15,3% de diagnósticos indeterminados, de acordo com seus estudos, em que não se reconhece padrões morfológicos padronizados nas escalas de classificação.

Do mesmo modo, os autores apontam local, idade e morfologia da lesão, além do estado imunológico do paciente como critérios importantes na viabilidade do diagnóstico.

Velasco et al.³² sugere o diagnóstico pela pesquisa do patógeno em amostras obtidas por aspiração de medula óssea submetidas à histoquímica pela técnica de Ziehl-Nielsen, constituindo uma forma distinta da biópsia de tegumento, que constitui o exame clássico da lesão.

Contudo, o exame histopatológico apresenta limitações e sabe-se, por estudos recentes, que sua associação com a investigação clínica garante precisão e confiabilidade aos resultados^{31,33} diante de quadros morfológicos imprecisos e respostas celulares instáveis. Na investigação das formas de hanseníase neural pura, Medeiros e colaboradores³⁴ descrevem que o exame histopatológico é insuficiente, sendo que a imunomarcagem do lipoarabinomano (LAM) e do glicolípido fenólico 1 (PGL1), presentes na parede do *M. leprae* contribui significativamente para o diagnóstico do patógeno no tecido nervoso.

Para o diagnóstico precoce e nos casos classificados apenas como suspeitos há, contudo, uma carência em ambos os recursos. Natrajan et al.³⁵ aponta que a investigação pelo método da *PCR in situ* permite um diagnóstico de até 70% dos casos em formas precoces e 60% nos casos suspeitos, em pacientes diagnosticados

respectivamente em 32% e 20% empregando-se os recursos de rotina.

Assim sendo, a utilização das alterações morfológicas como recurso independente para a finalização do diagnóstico da hanseníase não garante, portanto, eficiência para todos os pacientes, contemplando toda a casuística. Observando os diversos aspectos da aplicabilidade do exame histopatológico, pode-se inferir que métodos combinados de diagnóstico aliando a clínica, a biologia molecular e a imunohistoquímica, oferecem respostas adequadas ao polimorfismo observado na hanseníase.

Do ponto de vista operacional, dificuldades associadas à realização do procedimento de coleta da amostra, conservação e envio do material coletado das unidades básicas para laboratórios de referência, podem caracterizar um obstáculo para a implantação do serviço anátomo-patológico, dificultando a inclusão desse procedimento como protocolo na rotina diagnóstica.²⁸

Reação de Mitsuda

Trata-se de uma reação intradérmica com 0,1 ml da lepromina humana, realizada na superfície de flexão do antebraço direito, 4 cm abaixo da dobra antecubital, com leitura na 4ª semana. É produzida pelo Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, São Paulo, com uma suspensão de 6×10^7 bacilos/ml mortos pelo calor e o resultado é medido pelo diâmetro da induração local, registrada em milímetros. A ausência de pápula, ou pápula menor do que 5 mm de diâmetro, confere um resultado negativo a reação de Mitsuda e nódulo maior que 5 mm de diâmetro ou com ulceração, resultado positivo.³⁶

O alto valor prognóstico da reação de Mitsuda deve-se ao fato que na reação negativa há

ausência de resposta imunitária do tipo celular, mostrando a falta de defesa do organismo ao *M. leprae*; assim sendo, ao adquirir a doença, o indivíduo evolui para sua forma mais grave. No entanto, uma reação positiva indica presença de imunidade celular ao *M. leprae*, ou uma capacidade relativa de defesa do organismo, que poderia não evoluir ou evoluir para forma tuberculoide.³⁷

Desde o surgimento do primeiro teste cutâneo em 1919, várias modificações foram realizadas para dar origem à reação de Mitsuda. Testes cutâneos de segunda geração estão sendo pesquisados a partir de proteínas fracionadas e de frações subcelulares do bacilo de Hansen³⁸ ou direcionam na tentativa de produção de um teste cutâneo a partir de peptídeos sintéticos denominados permissíveis ou promíscuos, capazes de ligação em diversas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo HLA (Antígenos Leucocitários Humanos), que poderiam identificar a infecção ao *M. leprae* em diferentes grupos étnicos com diferentes tipos de moléculas HLA.¹⁴

Sorologia

Diversos estudos nacionais e internacionais têm relatado a resposta imune diante do bacilo de Hansen e o uso da sorologia para auxiliar na classificação de pacientes para fins de tratamento, monitoramento de terapia, risco de recidiva e na seleção dos contatos com maior risco de adoecer.^{25,39,40}

Pesquisas mostram que a estreita relação da soropositividade com a carga bacilar torna útil o emprego da sorologia no diagnóstico de casos primariamente neurais, sem lesões de pele visíveis ou baciloscopia positiva, na adequação da poliquimioterapia (PQT) em pacientes

multibacilares (MB), nos casos com altos títulos séricos e pequeno número de lesões cutâneas visíveis, ou seja, pacientes paucibacilares pelo critério de contagem de número de lesões e em casos em que a clínica de MB não corresponde à baciloscopia e/ou biópsia de lesão cutânea.¹⁰

O antígeno glicolípido fenólico-1(PGL-1) foi descrito na década de 80 como antígeno imunogênico específico do *Mycobacterium leprae*, surgindo assim os primeiros testes sorológicos, sendo o *enzyme linked immunosorbent assay*-ELISA o mais utilizado. O PGL-1 é o principal glicolípido antigênico do bacilo de Hansen produzindo anticorpos das classes IgG (Imunoglobulina do tipo G) e IgM (Imunoglobulina do tipo M), que estão relacionados com a forma clínica e a atividade da doença.^{17,41} A detecção de anticorpos IgM ao glicolípido fenólico I (PGL-I), no sorodiagnóstico é o melhor teste padronizado e o mais avaliado na hanseníase. A molécula PGL-I apresenta um trissacarídeo único, sendo seu principal determinante antigênico a última parte di- e trissacarídeo. Após a descoberta desse antígeno, vários outros foram produzidos, sendo desenvolvidos também diversos ensaios sorológicos para detectar a presença de anticorpos das classes IgM, IgG e IgA.²⁵

O índice baciloscópico baixo ou ausente e presença de resposta imune celular e não resposta imune humoral limita o valor diagnóstico da sorologia anti PGL-I na hanseníase paucibacilar, mas esta é altamente específica nos pacientes multibacilares. Outra limitação está no fato de que parte significativa de indivíduos saudáveis pode apresentar sorologia anti PGL-I positiva em áreas endêmicas.^{42,43}

Os testes anti PGL-I associados à clínica podem colaborar na classificação de hanseníase

multibacilar e paucibacilar e na escolha do tratamento com mais especificidade que a contagem do número de lesões.⁴²

A detecção de anticorpos anti PGL-I ocorre pelos métodos ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), aglutinação de partículas e testes imunocromatográficos – *dipstick* e *ML Flow*.⁴²

A padronização da técnica ELISA *in house* apresenta as vantagens de ampla disponibilidade dos equipamentos necessários, visto que é quase universalmente aplicável,^{44,45} sendo facilmente adaptável aos analisadores automáticos. São ensaios rápidos, simples, e seu baixo custo e resultados quantitativos fazem com que o teste seja preferível para estudos epidemiológicos de grande escala e acompanhamento dos pacientes e, ainda, durante o tratamento de pacientes MB, a repetição do teste de ELISA pode ser uma maneira de verificar se o tratamento está surtindo efeito.^{25,46}

Já o Teste de Aglutinação de Partículas (MPLA) é considerado prático para ser utilizado em grandes inquéritos epidemiológicos e em laboratórios pouco equipados. A aglutinação de glóbulos de gelatina recobertos por uma camada de trissacarídeo sintético pelos anticorpos anti PGL-I são utilizados na metodologia.⁴⁶

Os testes imunocromatográficos *dipstick* e *ML Flow* são utilizados para detecção de anticorpos IgM contra o glicolípido fenólico específico do *M. leprae* (PGL-I) presente em amostras de soro e sangue total humano, sendo considerados os ensaios mais rápidos e facilmente aplicáveis dentre os testes sorológicos disponíveis. Estes testes utilizam o PGL-I impregnado em uma base de nitrocelulose, a qual é submetida a etapas de incubação com a amostra e de lavagens, fornecendo resultados de fácil interpretação da

presença ou ausência de anticorpos anti-pGL-I na amostra do paciente.^{25,46-48}

A identificação de novas proteínas específicas ou peptídeos do *Mycobacterium leprae*, adequados para o diagnóstico sorológico da hanseníase, são alvos de estudos baseados em sequências genômicas. A exemplo disto, a técnica dos micro arranjos estuda arranjos com proteínas isoladas da parede celular ou membrana do bacilo ou ainda com proteínas recombinantes, que associadas ao antígeno PGL-I parecem melhorar o diagnóstico de pacientes pauci e multibacilares. Outra ferramenta utilizada nas pesquisas para aprimorar a seleção de antígenos é a bioinformática, principalmente para reduzir as chances de reação cruzada e detectar epítomos promíscuos imunodominantes para células T nas proteínas do *Mycobacterium leprae*.⁴⁹

Ferramentas moleculares

O sequenciamento completo do genoma do *M. leprae* abriu portas no entendimento do complicado mecanismo da doença e nas pesquisas relativas à busca de novos testes para o diagnóstico. Esse sequenciamento mostrou, por exemplo, a drástica redução gênica desse patógeno em relação ao *M. tuberculosis* e outras micobactérias, o que poderia explicar a impossibilidade de cultivo em meios de cultura devido à falta de vias biossintéticas essenciais para tanto.⁵⁰

A reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) passou a ser utilizada como método de suporte alternativo às metodologias tradicionais para o diagnóstico da hanseníase na década de 90. Sua utilização tornou-se possível com a descoberta de sequências espécie-específicas no genoma do *M. leprae*, o que forneceu a possibilidade de

detecção específica, sensível e rápida do DNA do *M. leprae* em espécimes clínicos.^{51,46}

A alta sensibilidade da PCR possibilita a amplificação enzimática de sequências específicas, a partir de uma quantidade mínima de DNA. Com isso, antígenos e regiões-alvo têm sido utilizados em diversos estudos.⁵² Entretanto, em paciente paubacilar, a sensibilidade da reação para *M. leprae* embora tenha aumentado, ainda encontra-se abaixo de 80%.^{53,42}

Estudos conduzidos com diferentes espécimes clínicos têm demonstrado grandes variações na sensibilidade da PCR. Análises comparativas, realizadas para a detecção do DNA do *M. leprae* em amostras de sangue, linfa e secreções nasais para todas as formas clínicas da doença, mostraram que a amplificação a partir de amostras de sangue apresenta sensibilidade inferior quando comparada à sensibilidade apresentada pelas outras amostras clínicas.¹⁰

Análises utilizando biópsias de pele de pacientes com hanseníase mostram que a técnica de PCR aumenta a sensibilidade da detecção do *M. leprae* se comparada à histopatologia e baciloscopia convencionais.¹⁴

De acordo com Stefani,⁴² em estudo para casos de hanseníase paubacilar com lesão única foi observada uma positividade de 43% para *M. leprae* em biópsias de pele, resultado promissor se comparado com as baixas taxas de detecção do bacilo em tecidos e com a impossibilidade de cultivo em meios artificiais.

Martinez e colaboradores⁵⁴ conduziram um estudo utilizando amostras de secreção nasal, considerando que o trato respiratório superior é a principal porta de entrada do bacilo. No entanto, nenhuma correlação direta da positividade da PCR com o desenvolvimento

de hanseníase foi observado. Corroborando com outros trabalhos, a positividade nessas amostras evidencia o carreamento bacilar, mas não necessariamente doença.⁵⁵

A PCR em tempo real demonstrou ser mais sensível que a PCR convencional para detectar DNA do *M. leprae* em amostras clínicas, nas quais os bacilos não foram detectáveis por coloração de histologia. Para o diagnóstico de hanseníase e para a determinação da viabilidade do bacilo a PCR baseada em transcrito reverso do RNA ribossomal do *M. leprae* também tem sido utilizada.^{56,42}

Em centros de referência, a técnica de PCR para DNA de *M. leprae* auxilia o diagnóstico de casos mais difíceis. Entretanto, seu alto custo, sofisticada tecnologia e a limitada sensibilidade para os casos paubacilares inviabilizam sua incorporação no diagnóstico de rotina na hanseníase. Contudo, na pesquisa auxilia a compreensão da epidemiologia da doença na comunidade.^{12,14,42}

O desenvolvimento de testes de DNA “*fingerprunte*” para distinção de casos de reativação e transmissão recente, como os utilizados para o *M. tuberculosis* também tem sido aventados na era da biologia molecular.^{57,14}

CONCLUSÃO

Existem ainda desafios a serem enfrentados quando se trata do diagnóstico da hanseníase, visto que ainda não há um exame considerado “padrão ouro” para o diagnóstico da doença. Novos métodos estão sendo estudados e testados, mas nem todos são viáveis do ponto de vista da saúde pública, por possuírem tecnologia sofisticada e alto custo. Outros, apesar de serem de simples execução, não

oferecem valor efetivo para o diagnóstico, sendo apenas importantes quando se trata do prognóstico da doença.

Grande parte dos estudos citados nessa revisão conclui que diversos testes laboratoriais são eficazes para os casos multibacilares da doença, mas há dificuldade de estabelecimento de um teste diagnóstico para os casos

paucibacilares, requerendo ainda investimentos em pesquisas.

Certamente outros estudos não citados nessa revisão estão em desenvolvimento, à luz dos novos conhecimentos nas áreas da imunologia, da biologia molecular e da bioinformática, em busca de um teste laboratorial efetivo para o diagnóstico precoce da doença.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Guia para o controle de hanseníase. 3. ed. Brasília (DF): Departamento de Atenção Básica; 2002.
2. Sales AM, Ponce de Leon A, Duppre NC, Hacker MA, Nery JAC, Sarno EN et al. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e1013.
3. Martins MA. Qualidade de vida em portadores de hanseníase [dissertação de mestrado na Internet]. Campo Grande: Universidade Católica Dom Bosco; 2009. [acesso em 06 ago 2014]; Disponível em: http://www.livrosgratis.com.br/arquivos_livros/cp090508.pdf
4. Araújo S. Epidemiologia molecular da hanseníase: sorologia anti PGL-I e PCR em swab nasal de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares [dissertação de mestrado na Internet]. Uberlândia: Faculdade de Medicina da Universidade Federal; 2012 [citado 2012 set 3]. Disponível em: http://www.bdtf.ufu.br/tde_arquivos/7/TDE-2012-02-02T151726Z-2779/Publico/d.pdf
5. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: análise de indicadores selecionados na última década e desafios para eliminação. *Bol Epidem*. 2013;44(11):1-12.
6. World Health Organization (WHO). Global leprosy situation. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012;87(34):317-28.
7. Sobrinho RAS, Mathias TAF. Perspectivas de eliminação da hanseníase como problema de saúde pública no Estado do Paraná, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2008;24(2):303-14.
8. Sarno EN. A hanseníase no laboratório. *Hist Ciênc Saúde - Manguinhos*. 2003;10(Suppl 1):277-90.
9. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.125, de 07 de outubro de 2010. Aprova as diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. 198. *Diário Oficial da União*. 15 out 2010;Seção 1:55.
10. Barreto JA. Avaliação de pacientes com hanseníase na faixa virchowiana diagnosticados entre 1990 e 2000 tratados com poliquimioterapia 24 doses e seus comunicantes na fase de pós-eliminação em municípios de Santa Catarina [tese de doutorado na internet]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2011.
11. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol*. 2006;19(2):338-81.

12. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An Update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas dermo-sifiliogr.* 2013;104(7):554-63.
13. Macieira S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: Opromolla DVA. *Noções de Hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; 2000. p.13-8.
14. Martelli CMT et al. Endemias e epidemias brasileiras, desafios e perspectivas de investigação científica: hanseníase [periódico na Internet]. *Rev Bras Epidemiol.* 2002 [acesso em 15 out 2012]; 5(3):273-85. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-790X2002000300006&script=sci_arttext
15. Trabulsi LR, Althertum F. *Microbiologia*. 5. ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2008.
16. Mendonça VA, Costa RD, Brito-Melo GE, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia da hanseníase. *An. Bras. Dermatol.* 2008;83(4):343-50.
17. Araújo MG. Hanseníase no Brasil [periódico na Internet]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; 2003 [acesso em 19 set 2012]; 36(3):373-82. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v36n3/16339.pdf>
18. 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.
19. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase*. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
20. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Faber WR, Van Beers SM, Klatser PR et al. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. *Int J Epidemiol.* 2004;33(6):1329-36.
21. Boechat N, Pinheiro LCS. A hanseníase e sua quimioterapia [periódico na Internet]. *Rev Virtual Quim.*; 2012 [acesso em 14 out 2012];4(3):247-56. Disponível em: <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewFile/236/243>
22. Opromolla DVA, Arruda OS, Fleury RN. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados de inoculação do *Mycobacterium leprae*. *Hansen Int.* 1980;5(1):28-36.
23. Deps PD, Faria LV, Gonçalves VC, Silva DA, Ventura CG, Zandonade E. Aspectos epidemiológicos da transmissão da hanseníase em relação a exposição ao tatu [periódico na Internet]. *Hansen Int.*; 2003 [acesso em 15 out 2012];28(2):138-44. Disponível em: http://www.ilsl.br/revista/detalhe_artigo.php?id=10638
24. Macedo RE, Ferreira ABR, De Oliveira JHMC, Neumann AS, Britto CPC, Levy CMDA et al. Triatomíneos possuem potencial como vetores da hanseníase [periódico na Internet]. *Hansen Int.*; 2011 [acesso em 20 out 2012];36(1):44. Disponível em: http://www.ilsl.br/revista/detalhe_artigo.php?id=11347
25. Buhner-Sékula S. Sorologia PGL-I na hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008;41(Supl.2):3-5.
26. Barreto JA, Nogueira MES, Diorio SM, Buhner-Sékula S. Sorologia rápida para hanseníase (teste ML Flow) em pacientes dimorfos classificados como paucibacilares pelo número de lesões cutâneas: uma ferramenta útil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008;41(Supl.2):45-7.

27. Opromolla DVA. Noções de hansenologia. São Paulo: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato; 2000.
28. Ura S, Barreto JA. Papel da biópsia cutânea no diagnóstico de hanseníase [periódico na internet]. *Hansen Int.*; 2004 [acesso em 06/08/2014];29(2):141-4. Disponível em: http://www.ilsl.br/revista/detalhe_artigo.php?id=10689#
29. Pardillo FE, Fajardo TT, Abalos RM, Scollard D, Gelber RH. Methods for the classification of leprosy for treatment purposes. *Clin Infect Dis.* 2007;15;44(8):1096-9.
30. Pinquier L. Histopathology of leprosy. *Ann Dermatol Venereol.* 2011;138 (11):777-81.
31. Shivaswamy KN, Shyamprasad AL, Sumathy TK, Ranganathan C, Agarwal V. Clinico histopathological correlation in leprosy. *Dermatol online j.* 2012;18(9):2.
32. Velasco D, Lozano S, Villarrubia J. Leprosy diagnosed by bone marrow aspiration. *Br. J. haematol.* 2012;160(2):121.
33. Giridhar M, Arora G, Lajpal K, Singh Chahal K. Clinicohistopathological concordance in leprosy - a clinical, histopathological and bacteriological study of 100 cases. *Indian J Lepr.* 2012;84(3):217-25.
34. Medeiros MF, Jardim MR, Vital RT, Costa Nery JA, Sales AM, Moraes MO et al. An attempt to improve pure neural leprosy diagnosis using immunohistochemistry tests in peripheral nerve biopsy specimens. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013 May 22. [Epub ahead of print]
35. Natrajan M, Katoch K, Katoch VM, Das R, Sharma VD. Histological diagnosis of early and suspicious leprosy by in situ PCR. *Indian J Lepr.* 2012;84(3):185-94.
36. Garbino JA, Jardim MR, Marques JR W, Antunes SL, Soares CT, Heise CO et al. Projeto Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Hanseníase Neural Primária. Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, Instituto Lauro de Souza Lima – Bauru – São Paulo. Fevereiro de 2011.
37. Lastória JC. A reação de Mitsuda seriada na identificação das formas reacionais tuberculoide e dimorfa da hanseníase [tese de doutorado na internet]. Botucatu: Faculdade de Medicina UNESP; 1990 [acesso em 20 set 2012]. Disponível em: http://hansen.bvs.ilsl.br/textoc/teses/LASTORIA_JOEL_1/PDF/LASTORIA_JOEL.pdf
38. Brenan PJ. Skin test development in leprosy: progress with first-generation skin test antigens, and an approach to the second generation. *Lepr. Rev.* 2000; 71(Supl):S50-4.
39. Bazan-Furini R, Motta AC, Simão JC, Tarquinio DC, Marques Junior W, Barbosa MH et al. Early detection of leprosy by examination of household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2011;106(5):536-40.
40. Amador MPSC, Cunha MHCM, Cruz CAV. Análise imunodiagnóstica do teste anti-PGL-I na diferenciação entre hanseníase clínica e reação hansênica pós-cura. *Cad. Saúde Colet.* 2007;15(3):357-68.
41. Geluk A, Van der Ploeg J, Teles RO, Franken KL, Prins C, Drijfhout JW et al. Rational combination of peptides derived from different Mycobacterium leprae proteins improves sensitivity for immunodiagnosis of M. leprae infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008;15(3):522-33.

42. Stefani MMA. Desafios na era pós genômica para o desenvolvimento de testes laboratoriais para o diagnóstico da hanseníase. *Rev Soc Bras Med.* [periódico na Internet]. 2008 [acesso em 19 set 2013];41(Supl.2):89-94. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41s2/v41s2a18.pdf>
43. Hungria EM, Oliveira RM, Souza AL, Costa MB, Souza VN, Silva EA et al. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2012;107(Supl. 1):104-11.
44. Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, Bühner-Sékula S. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008;41(Supl. 2):11-8.
45. Duthie MS, Truman RW, Goto W, O'Donnell J, Hay MN, Spencer JS et al. Insight toward early diagnosis of leprosy through analysis of the developing antibody responses of *Mycobacterium leprae*-infected armadillos. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011;18(2):254-9.
46. Silva RC. Estudo do comportamento dos testes sorológicos ML FLOW e ELISA (PGL-I) em áreas endêmicas e não endêmicas de hanseníase [tese de doutorado na internet]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2008 [acesso em 22 nov 2012]. Disponível em: http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/ECJS-7F3N7T/rozana_castorina_silva.pdf?sequence=1
47. Oliveira MLW, Cavalière FAM, Maceira JMP, Bühner-Sékula S. O uso da sorologia como ferramenta adicional no apoio ao diagnóstico de casos difíceis de hanseníase multibacilar: lições de uma unidade de referência. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008;41(Supl.2):27-33.
48. Lobato J, Costa MP, Reis EM, Gonçalves MA, Spencer JS, Brennan PJ et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr. Rev.* 2011;82(4):389-401.
49. Groathouse NA, Amin A, Marques MA, Spencer JS, Gelber R, Knudson DL et al. Use of protein microarrays to define the humoral immune response in leprosy patients and identification of disease-state-specific antigenic profiles. *Infect. Immun.* 2006;74(11):6458-66.
50. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001;409(6823):1007-11.
51. Katoch VM, Lavania M, Chauhan DS, Sharma R, Hirawati, Katoch K. Recent advances in molecular biology of leprosy. *Indian J Lepr.* 2007;79(2-3):151-66.
52. 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. doi: 10.1371/journal.pntd.0001354. Epub 2011 Oct 11.
53. Goulart IM, Cardoso AM, Santos MS, Gonçalves MA, Pereira JE, Goulart LR. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. *Arch. Dermatol. Res.* 2007; 299(5-6):267-71.
54. Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IMB. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA

- detection and the immunological status. *Clin. microbiol. infect.* 2011;11(17):1653-8.
55. Almeida EC, Martinez AN, Maniero VC, Sales AM, Duppre NC, Sarno EN et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of brazilian household contacts. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2004;99(5):509-11.
56. Li W, Matsuoka M, Kai M, Thapa P, Khadge S, Hagge DA et al. Real-time Real-time PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types. *J. Clin Microbiol.* 2012; 50(3):742-53. doi: 10.1128/JCM.05183-11.
57. Young D. Leprosy: a post-elimination research agenda. *Trends Micobiol.* 1998;6(6):217-8.

Correspondência/corresponde to:

Heloisa da Silveira Paro Pedro
Instituto Adolfo Lutz CLR, São José do Rio Preto
Rua Alberto Sufredine Bertoni, 2325, Maceno,
CEP 15060-020
São José do Rio Preto, SP – Brasil
E-mail: hsp Pedro@ial.sp.gov.br