



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-Graduação em Enfermagem

NAIARA CRISTINA ULE BELOTTI DE SOUZA

Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da Hanseníase

São José do Rio Preto
2021

NAIARA CRISTINA ULE BELOTTI DE SOUZA

Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da Hanseníase

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Enfermagem da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Processo de Trabalho em Saúde. *Linha de Pesquisa:* Processo de Cuidar nos Ciclos de Vida (PCCV). *Grupo de Pesquisa:* Educação em Saúde (EDUS).

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Eli Gazetta

**São José do Rio Preto
2021**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESSE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

SOUZA, NAIARA CRISTINA ULE BELOTTI

Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da Hanseníase / Naiara Cristina Ule Belotti de Souza.

São José do Rio Preto; 2021.

72 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Enfermagem da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

Área de Concentração: Processo de Trabalho em Saúde

Linha de Pesquisa: Processo de Cuidar nos Ciclos de Vida (PCCV)

Grupo de Pesquisa: Educação em Saúde (EDUS)

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Eli Gazetta

1. Hanseníase; 2. Epidemiologia; 3. Imunocromatografia; 4. Corantes.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Claudia Eli Gazetta
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Profa. Dra. Fernanda Modesto Tolentino Binhardi
Instituto Adolfo Lutz

Profa. Dra. Natália S. G. Marin dos Santos Sasaki
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 02/12/2021

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Senhor da minha vida, por iluminar meu caminho todos os dias com tantas bênçãos e me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, Osni e Ivaldete, por todo amor, empenho e dedicação para minha formação pessoal e profissional. Obrigada por todas as orações, vocês são meu porto seguro.

Ao meu esposo Bruno, minha fonte de inspiração de bom humor e criatividade. Meu amor de infância, meu companheiro de vida, minha dose diária de alegria.

À minha orientadora Profa. Dra. Claudia Eli Gazetta, por ter me acolhido como sua aluna de pós-graduação e por acreditar em mim.

À minha companheira de trabalho, Profa. Dra. Heloísa da Silveira Paro Pedro, “Helô”, que sempre esteve disposta a me ajudar em minha carreira profissional e na produção desse trabalho. Quanta gratidão eu sinto por ter seu incentivo constante e por compartilhar diariamente seus conhecimentos comigo.

À Profa. Dra. Susilene Maria Tonelli Nardi, que sempre me incentivou a realizar o mestrado, pela colaboração nas análises estatísticas e pela contribuição na minha dissertação. Susi, você é uma grande inspiração na luta contra a Hanseníase.

À minha amiga e colega de trabalho, Naiady, por todo apoio nas análises laboratoriais. Sempre disposta a me ajudar, uma grande amiga que guardo com carinho no coração.

A todos os funcionários e amigos do Instituto Adolfo Lutz - CLR de São José do Rio Preto, minha família IAL, como sou grata pela vida e amizade de cada um de vocês.

Agradeço também a todos os funcionários das unidades de saúde dos municípios que participaram da pesquisa. Obrigada por acreditarem no meu trabalho e pela luta constante pela melhoria na saúde pública, pelo carinho e cuidado com os pacientes portadores de Hanseníase.

A todos que sempre torceram por mim, que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desse trabalho, gratidão!

*“Uma conquista não significa que podemos descansar,
o sucesso do chão já percorrido é apenas combustível
para podermos prosseguir”.*
(Eric Ventura)

Dedico esse trabalho à minha amiga
Juliana Kindler Figueiredo (*in memoriam*), com
todo meu amor.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Resumen	vii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos Gerais da Doença	1
1.2 Epidemiologia da Hanseníase	3
1.3 Diagnóstico Clínico e Laboratorial	4
1.4 Relevância e Justificativa	6
2 OBJETIVO	9
2.1 Objetivo Geral	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3 MÉTODOS.....	10
3.1 Aspectos Éticos	10
3.2 Delineamento do Estudo	10
3.3 População e Período de Estudo	10
3.4 Procedimentos para Coleta de Dados e Amostras Biológicas	11
3.5 Métodos Laboratoriais	13
3.5.1 Teste ML Flow	13
3.5.2 Coloração por Auramina O	15
3.5.3 Coloração por Ziehl-Neelsen	17
3.5.4 Leitura Microscópica	17
3.6 Avaliação Neurológica Simplificada (ANS)	18
3.7 Critérios Inclusão	18
3.8 Critérios de Exclusão	18
3.9 Análises Estatísticas	19
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÕES.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
APÊNDICES	38
ANEXOS.....	47
MANUSCRITO	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Local de coleta em pacientes com ausência de lesões.....	11
Figura 2.	Local de coleta em pacientes com presença de lesões.....	12
Figura 3.	Fluxograma para coleta de dados e amostras biológicas.....	13
Figura 4.	Plataforma do Teste ML Flow	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Perfil dos 94 participantes do estudo e resultados dos exames laboratoriais no período de agosto de 2020 a maio de 2021	20
Tabela 2.	Concordância entre as baciloscopias e o teste sorológico ML Flow dos 94 pacientes avaliados	21
Tabela 3.	Distribuição dos resultados do teste ML FLOW segundo o Índice Baciloscópico (ZN) dos pacientes avaliados no estudo	22
Tabela 4.	Concordância dos resultados entre as técnicas de baciloscopia de Ziehl-Neelsen e Auramina dos 94 participantes	23
Tabela 5.	Distribuição da frequência dos dados clínicos quando relacionados aos resultados positivos dos três testes laboratoriais avaliados	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ANS	Avaliação Neurológica Simplificada
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAAR	Bacilo álcool-ácido-resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CGDE	Coordenação-Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação
CLR	Centro de Laboratório Regional
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DEVIT	Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis
DP	Desvio-padrão
DRS	Departamento Regional de Saúde
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FF	Fite-Faraco
GAL	Gerenciador de Ambiente Laboratorial
GIF	Grau de Incapacidade Física
GVE	Grupo de Vigilância Epidemiológica
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IAL-SJRP	Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto
IB	Índice Bacilosκόpio
IC	Intervalo de Confiança
IgM	Imunoglobulina M
LID-I	Leprosy IDRI Diagnostic-I
MB	Multibacilar
MS	Ministério da Saúde
NDO-LID	Natural Disaccharideoctyl Leprosy IDRI Diagnostic
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Paucibacilar
PGL-I	Glicolípido Fenólico-I
PQT	Poliquimioterapia
RPM	Rotação por Minuto
SINAM	Sistema Nacional de Atendimento Médico

SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
ZN	Ziehl-Neelsen

RESUMO

SOUZA, NCUB. Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da hanseníase. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação Stricto Sensu em Enfermagem. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2021.

OBJETIVO: Avaliar as técnicas de coloração para baciloscopia de raspado intradérmico por Ziehl-Neelsen e Auramina O, associando com os resultados do teste ML Flow para verificar a contribuição desses no diagnóstico e auxiliar na classificação clínica da hanseníase. **MÉTODOS:** Foi realizado um estudo prospectivo com 94 pacientes com suspeita da doença, atendidos por demanda espontânea, no período de 2020 a 2021 nas unidades de saúde da região de São José do Rio Preto-SP. Para a baciloscopia foram realizados os métodos de coleta e coloração preconizada pelo Ministério da Saúde. Os esfregaços foram corados primeiramente por Auramina O, e após a leitura por fluorescência, foram recorados por Ziehl-Neelsen. O teste ML Flow foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Bühner-Sékula. Para a análise de concordância, utilizou-se o Índice de Kappa e os valores significantes de $p \leq 0,05$ foram considerados para verificar a associação entre as variáveis. **RESULTADOS:** Foram diagnosticados com hanseníase 31 pacientes, sendo detectada maior positividade pelo Teste ML Flow (28,7%), seguidos de baciloscopia positiva por Ziehl-Neelsen (22,4%) e Auramina O (16,0%). Observou-se melhor concordância entre os resultados dos testes ML Flow e baciloscopia por Ziehl-Neelsen (Kappa= 0,72). Os resultados obtidos entre as técnicas de baciloscopia por Ziehl-Neelsen e Auramina O tiveram concordância substancial (Kappa= 0,79), de acordo com os critérios de Landis e Koch. Foram classificados 27 pacientes como multibacilares, sendo que 85,2% dos casos foram associados aos resultados positivos pelo teste ML Flow. **CONCLUSÃO:** Entre as três técnicas laboratoriais avaliadas, o teste ML Flow apresentou maior desempenho e positividade. Por ser um teste rápido e de fácil execução, pode ser uma ferramenta útil e eficaz no diagnóstico precoce de casos de hanseníase

Descritores: Hanseníase; epidemiologia; imunocromatografia; corantes.

ABSTRACT

SOUZA, NCUB. Comparative study between different staining techniques in bacilloscopy and the rapid ML Flow test for the diagnosis, clinical classification and leprosy control. 72 f. Dissertation (Masters) – Post-Graduation Stricto Sensu in Nursing. Faculty of Medicine of São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2021.

OBJECTIVE: To evaluate staining techniques for bacilloscopy of intradermal smears by Ziehl-Neelsen and Auramine O, associating them with the results of the ML Flow test to verify their contribution to the diagnosis and help in the clinical classification of leprosy. **METHODS:** A prospective study was carried out with 94 patients suspected of having the disease, treated by spontaneous demand, in the period from 2020 to 2021 in health units in the region of São José do Rio Preto-SP. For bacilloscopy, the collection and staining methods recommended by the Ministry of Health were performed. The smears were first stained with Auramine O, and after reading by fluorescence, they were stained by Ziehl-Neelsen. The ML Flow test was performed according to the protocol described by Bühler-Sékula. For the agreement analysis, the Kappa index was used and the significant values of $p \leq 0.05$ were considered to verify the association between the variables. **RESULTS:** Thirty-one patients were diagnosed with leprosy, with higher positivity detected by the ML Flow Test (28.7%), followed by positive bacilloscopy by Ziehl-Neelsen (22.4%) and Auramine O (16.0%). A better agreement was observed between the results of the ML Flow and Ziehl-Neelsen bacilloscopy tests (Kappa= 0.72). The results obtained between the smear microscopy techniques by Ziehl-Neelsen and Auramine O had substantial agreement (Kappa = 0.79), according to the criteria of Landis and Koch. Twenty-seven patients were classified as multibacillary, and 85.2% of cases were associated with positive results by the ML Flow test. **CONCLUSION:** Among the three laboratory techniques evaluated, the ML Flow test had the highest performance and positivity. As it is a quick and easy-to-perform test, it can be a useful and effective tool in the early diagnosis of leprosy cases.

Descriptors: Leprosy; epidemiology; immunochromatography; dyes.

RESUMEN

SOUZA, NCUB. Estudio comparativo entre diferentes técnicas de tinción en baciloscopia y la prueba rápida ML Flow para el diagnóstico, clasificación clínica y control de la lepra. 62 f. Disertación (Maestría) - Postgrado Stricto Sensu en Enfermería. Facultad de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2021.

OBJETIVO: evaluar las técnicas de tinción para frotis de frotis intradérmicos de Ziehl-Neelsen y Auramine O, asociándolas con los resultados de la prueba ML Flow para verificar su contribución al diagnóstico y ayudar en la clasificación clínica de la lepra. **MÉTODOS:** Se realizó un estudio prospectivo con 94 pacientes sospechosos de padecer la enfermedad, atendidos por demanda espontánea, en el período de 2020 a 2021 en unidades de salud de la región de São José do Rio Preto-SP. Para la microscopía de frotis de esputo se realizaron los métodos de recolección y tinción recomendados por el Ministerio de Salud. Los frotis se tiñeron primero con Auramine O y, después de leerlos por fluorescencia, se tiñeron con Ziehl-Neelsen. La prueba ML Flow se realizó según el protocolo descrito por Bühner-Sékula. Para el análisis de concordancia se utilizó el índice Kappa y se consideraron los valores significativos de $p \leq 0.05$ para verificar la asociación entre las variables. Treinta y un pacientes fueron diagnosticados de lepra, con mayor positividad detectada por el ML Flow Test (28,7%), seguido de baciloscopia positiva por Ziehl-Neelsen (22,4%) y Auramina O (16,0%). Se observó una mejor concordancia entre los resultados de las pruebas de baciloscopia ML Flow y Ziehl-Neelsen (Kappa = 0,72). **RESULTADOS:** Los resultados obtenidos entre las técnicas de frotis de Ziehl-Neelsen y Auramine O tuvieron concordancia sustancial (Kappa = 0,79), según los criterios de Landis y Koch. Veintisiete pacientes se clasificaron como multibacilar y el 85,2% de los casos se asociaron con resultados positivos en la prueba ML Flow. **CONCLUSIÓN:** Entre las tres técnicas de laboratorio evaluadas, la prueba ML Flow mostró el mayor rendimiento y positividad. Al ser una prueba rápida y fácil de realizar, puede ser una herramienta útil y eficaz en el diagnóstico precoz de los casos de lepra.

Descriptores: Lepra; epidemiología; inmunocromatografía; tintes.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais da Doença

A Hanseníase é doença infectocontagiosa de evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae*, parasita intracelular obrigatório com predileção por células da pele e dos nervos periféricos. O comprometimento dos nervos periféricos é a característica principal da doença, o que lhe confere grande potencial para provocar incapacidades e deficiências físicas.¹

O *Mycobacterium leprae* foi descoberto, em 1873, pelo cientista norueguês Gerhard Henryk Armauer Hansen, razão pela qual é denominado de Bacilo de Hansen e é considerada como a primeira bactéria patógena para o homem.² É um bacilo álcool-ácido resistente, imóvel, não formador de esporos, parasita intracelular obrigatório, com predileção por células de Schwann e macrófagos. O grande desafio para os microbiologistas é o fato do *M. leprae* ainda não ter sido cultivado *in vitro*. No entanto, consegue sua multiplicação pela inoculação no coxim plantar de camundongos imunocompetentes. Os bacilos também se reproduzem em tatus e macacos.³⁻⁴

O Bacilo é gram positivo, com parede celular de elevado teor de lipídios estruturais, responsáveis por provocar grande hidrofobicidade dificultando a ação dos diferenciadores de corantes aquosos. Desta forma, cora-se pela fucsina e não descora pelos ácidos e álcoois quando corado pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN), conferindo a característica de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR). Podem se apresentar isolados ou em globias nas lâminas coradas.⁴⁻⁵

A Hanseníase é transmitida de pessoa para pessoa por meio de convívio íntimo e prolongado com doentes de formas infectantes sem tratamento.⁶⁻⁷ A principal porta de entrada do bacilo são as vias aéreas superiores, também podem ocorrer transmissão através da pele ou mucosa. No entanto, a transmissão depende do tempo de contato próximo e prolongado de uma pessoa susceptível com um doente bacilífero não tratado.⁷⁻⁸

A classificação da Hanseníase determina o tipo e a duração do tratamento a ser efetuado; pode ser classificada de acordo com a classificação de Madri e de Ridley e Jopling.⁹

Segundo a classificação de Madri, a partir do Congresso Internacional de Hanseníase, na cidade de Madri, em 1953, as formas clínicas adotadas são divididas em Hanseníase Indeterminada, Hanseníase Tuberculóide, Hanseníase Dimorfa e Hanseníase Virchowiana. Nessa classificação, consideram-se duas formas polares estáveis (tuberculóide e virchowiana) e duas imunologicamente instáveis, denominadas dimorfa e indeterminada. A forma indeterminada é a primeira manifestação clínica, e pode evoluir para cura espontânea ou para

outra forma clínica em meses ou anos. Esta classificação é a utilizada na ficha de notificação do Brasil. Já a classificação proposta por Ridley e Jopling é baseada em critérios imunopatológicos.⁸

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o Grau de Incapacidades Físicas (GIF) na Hanseníase em 0 (zero), 1 (um) e 2 (dois). O GIF 0 significa nenhuma deficiência em olhos, mãos e pés. O GIF 1 significa diminuição ou perda da sensibilidade da córnea e diminuição da força muscular do orbicular dos olhos; para as mãos e pés classifica-se como GIF 1 quando há diminuição da força muscular e/ou alteração da sensibilidade na palma das mãos e na planta dos pés, sem deformidades visíveis. O GIF 2 significa que há deformidades visíveis nos olhos, mãos e pés.⁸ No Brasil, em 2019, foram identificados 2.351 casos novos de Hanseníase com GIF 2 no diagnóstico, mantendo o país em um parâmetro de endemicidade para esse indicador.¹⁰

Além dos casos novos e pacientes em controle de tratamento, há ainda definição de casos de recidivas em Hanseníase. De acordo com a Nota Informativa nº 51, de 2015 CGHDE/DEVIT/SVS/MS¹¹, “é definido como *RECIDIVA* todos os casos de Hanseníase tratados regularmente com esquemas oficiais padronizados e corretamente indicados, que receberam alta por cura, isto é, saíram do registro ativo da doença no SINAN, e que voltam a apresentar novos sinais e sintomas clínicos de doença infecciosa ativa. Os casos de recidiva em Hanseníase geralmente ocorrem em período superior a cinco anos, após a cura. A partir da confirmação da recidiva, estes casos devem ser notificados no modo de entrada recidiva”. Em 2019, foram relatados por 54 países 3897 novos casos de recidivas, sendo 44% deles notificados somente no Brasil.¹⁰

Para fins de tratamento poliquimioterápico (PQT), a classificação da doença também pode se basear no número de lesões cutâneas de acordo com os critérios: paucibacilar (PB) – casos com até cinco lesões de pele e multibacilar (MB) – casos com mais de cinco lesões de pele ou comprometimento de nervos ou baciloscopia positiva, independentemente, do número de lesões cutâneas.⁹ A classificação operacional deve ser feita considerando a história clínica, epidemiológica e o exame dermatoneurológico. O resultado da baciloscopia positiva classifica o caso como MB, porém, o resultado negativo não exclui o diagnóstico clínico da Hanseníase e também não classifica obrigatoriamente o doente como PB.^{8,12}

O regime de poliquimioterapia para pacientes adultos PB são de duas drogas – rifampicina e dapsona – com seis doses durante o tratamento. O regime de tratamento padrão para pacientes adultos MB são três drogas – rifampicina, dapsona e clofazimina – com doze doses para o tratamento da hanseníase MB. A PQT é fornecida gratuitamente em nível global

pela NOVARTIS®. A OMS administra a distribuição da PQT aos países que coordenam programas nacionais de Hanseníase.¹³

O diagnóstico precoce e o tratamento completo com poliquimioterapia, continuam sendo uma das principais estratégias para a diminuição da doença. Uma das formas utilizadas para prevenção da Hanseníase é a vacina BCG (Bacilo Calmette-Guérin), uma das mais antigas e foi usada a primeira vez em humanos, em 1921.¹⁵ É recomendada a vacinação com BCG ao nascimento como ferramenta para reduzir o risco de tuberculose e ativar o sistema imunológico. Ela é preparada com bacilos vivos, a partir de cepas do *Mycobacterium bovis*, atenuadas com glutamato de sódio. A vacina é administrada por via intradérmica na porção inferior do músculo deltóide, face superior do braço direito. Geralmente, a vacinação causa uma cicatriz superficial no local devido os processos inflamatórios. A vacina BCG é usada em contatos intra e extradomiciliares de doentes de hanseníase, que conviveram com o portador. Cerca de 10% a 24% dos indivíduos receptores da vacina não desenvolvem a cicatriz, e essa ausência não significa necessariamente falha de imunização, porém, a vacina BCG não é específica para hanseníase.^{8,14} Há estudo de testes de outras vacinas existentes, como a LepVax (em fase de testes), que podem resultar em novas ferramentas para prevenção da doença.¹⁶

1.2 Epidemiologia da Hanseníase

A Hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública, principalmente, nos países cujas taxas de prevalência ultrapassam um caso por 10.000 habitantes.¹⁵

Manifesta-se, principalmente, em populações aglomeradas com precárias condições sanitárias e de acesso aos sistemas de saúde, por isso, está incluída dentro do grupo de doenças negligenciadas.^{7,12}

A detecção de casos novos tem apresentado uma diminuição lenta e significativa¹⁵, no entanto, cinco regiões da OMS relataram aumento no número de casos novos. Os três países com maiores encargos de casos novos no ano de 2017, foram: Índia, Brasil e Indonésia. Embora o número total de casos venha diminuindo lentamente; o de casos novos não se alinha com os esforços globais e recursos implantados para interromper a transmissão da doença.¹⁵

Uma análise retrospectiva realizada no Brasil entre 2012 a 2016 de indicadores das regiões brasileiras, mostrou que a região Centro Oeste e Norte possuem as maiores médias de detecção geral e que a maioria dos casos no país ocorreu no sexo masculino em todas as faixas etárias, principalmente, a partir dos 15 anos de idade.^{12,17}

O projeto Estratégia Global para Hanseníase 2016 – 2020, cuja a meta era “*Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase*” e tinha como propósito a detecção precoce de casos novos e o tratamento imediato para reduzir a transmissão às populações vulneráveis, teve progresso mas não atingiu todos seus objetivos.¹⁸ Atualmente, foi desenvolvida a nova Estratégia Global para Hanseníase 2021 – 2030, com o objeto da interrupção da transmissão da doença, obtenção de zero casos autóctones e da redução de casos novos detectados com Grau 2 de Incapacidades.¹⁶

1.3 Diagnóstico Clínico e Laboratorial

O diagnóstico baseia-se nos sinais e sintomas característicos da doença, subsidiados por exames laboratoriais. Um caso de Hanseníase é definido pela OMS pela presença de um ou mais dos seguintes critérios: lesão de pele com alteração de sensibilidade térmica ou dolorosa; acometimento de nervo periférico com espessamento neural e presença de bacilos *M. leprae* confirmada na baciloscopia de esfregaço intradérmico ou na biópsia de pele.⁸

O exame clínico tem como propósito fazer a avaliação dermatoneurológica do paciente, buscando identificar os sinais e sintomas da doença. A avaliação dermatológica busca identificar as lesões de pele e pesquisar sua sensibilidade, e a avaliação neurológica busca identificar neurites, comprometimento de nervos periféricos e incapacidades físicas e deformidades, provocadas por essas lesões.¹⁹

O acometimento neural é uma característica importante da doença, resultando em alterações funcionais mínimas até respostas intensas com infiltração granulomatosa de todo parênquima neural. Os nervos mais acometidos são: o trigêmeo e o facial na face; o ulnar, mediano e radial nos membros superiores e o tibial posterior, fibular comum nos membros inferiores.²⁰

O processo inflamatório dos nervos (neurite) na Hanseníase sem tratamento adequado pode evoluir causando perdas sensitiva e motora. Por isso, a Avaliação Neurológica Simplificada (ANS) deve ser realizada no diagnóstico e durante todo o acompanhamento do paciente ou sempre que houver queixas. Essa avaliação neural é feita através de inspeção dos olhos, nariz, mãos e pés, palpação dos troncos nervosos periféricos, avaliação da força muscular e sensibilidade nos olhos, membros inferiores e superiores⁸ e é eficaz para determinar o grau de incapacidade física do paciente.¹⁹

A baciloscopia é um exame complementar, de fácil execução e de baixo custo na detecção de BAAR sugestivo de *M. leprae* diretamente de raspado intradérmico das lesões ou de outros locais de coleta selecionados, como lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos.¹⁹

O exame baciloscópico do raspado dérmico quando positivo, demonstra a presença da micobactéria e indica os pacientes mais infectantes.²¹ Sua especificidade é próxima a 100%, entretanto, apresenta baixa sensibilidade.^{21,22,23} Um resultado negativo de baciloscopia não descarta o diagnóstico de Hanseníase; uma vez que nas formas paucibacilares os bacilos dificilmente são detectados. Portanto, continua sendo um desafio o diagnóstico e confirmação da doença, especialmente, em casos paucibacilares.

Os testes sorológicos para o diagnóstico da Hanseníase possuem baixa sensibilidade para pacientes paucibacilares, pois o nível de anticorpos pode ser muito baixo ou indetectável. No entanto, a sensibilidade é alta na maioria dos casos de pacientes multibacilares.²⁴ O glicolípido fenólico-I, ou PGL-I, é a molécula da parede celular do bacilo que confere maior resposta imunológica. Foi um dos primeiros antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* a ser isolado e caracterizado.²⁵ O LID-I (Leprosy IDRI diagnostic-I) é uma proteína proveniente da fusão entre proteínas recombinantes ML0405 e ML2331, que são específicas do *M. leprae*.²⁴ Posteriormente, foi desenvolvido um novo antígeno a partir da conjugação do dissacarídeo PGL-I com a proteína de fusão LID-I, o chamado NDO-LID (Natural Disaccharideoctyl Leprosy IDRI Diagnostic). Estudos recentes têm mostrado resultados discretamente superiores com antígenos NDO-LID quando isolados em pacientes PB e MB.²⁶

Os métodos utilizados para detectar anti-PGL-I incluem o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), teste de hemaglutinação passiva, teste de aglutinação com partícula de gelatina, dipstick e o teste de fluxo lateral (ML Flow e NDO-LID). Este último possui aproximadamente 95% de sensibilidade para formas multibacilares, mas ainda falha em detectar indivíduos com Hanseníase indeterminada e tuberculóide.²⁵⁻²⁶

Os antígenos PGL-I e LID-I representam importantes antígenos específicos para a sorologia da Hanseníase e sugere-se que sua associação melhore a sensibilidade sorológica para as formas paucibacilares e diagnóstico precoce.²⁷ Testes como exame histopatológico da pele lesada, inoculação em coxim de camundongos, testes sorológicos e métodos moleculares, estão limitados a serviços de referência e centros de pesquisa.^{23,28}

1.4 Relevância e Justificativa

O Departamento Regional de Saúde (DRS XV), constituído por 102 municípios, está localizado em São José do Rio Preto, cidade de médio porte, sede da 8ª região administrativa do Estado de São Paulo. O DRS XV está dividido entre os Grupos de Vigilância Epidemiológica (GVE) em nível regional, sendo de sua abrangência o GVE-29 e GVE-30, que estão vinculados à estrutura do Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac” (CVE/SP) que normatiza o Sistema de Vigilância Epidemiológica no Estado de São Paulo.

Apesar de a Hanseníase estar em fase de eliminação na região de São José do Rio Preto – GVE 29, a doença ainda causa sérios problemas físicos aos indivíduos acometidos. Porém, os indicadores epidemiológicos da Hanseníase mostram que 70% dos casos são notificados tardiamente, e as deficiências físicas atingem 33,2% dos pacientes em tratamento²⁹ e 32% dos pacientes após a alta medicamentosa.³⁰ Esse fato reflete no aumento da demanda em vários setores do serviço público em saúde, dificuldade de investimento na área e na demora do diagnóstico.

Estudos sobre a transmissão da Hanseníase demonstram que as pessoas que têm convívio e contato com os doentes estão expostas a um risco 3,5 vezes maior de adoecer quando comparadas com a população geral e o diagnóstico tardio continua sendo uma das grandes preocupações para eliminação da doença.³¹

No final do ano de 2018, foi registrada a diminuição mundialmente de 8501 casos de hanseníase em relação ao final de 2017; esse fato deu-se há várias campanhas ativas na detecção de novos casos e na triagem eficaz de contatos. Em 2018, a região da Ásia representou 71% dos casos novos de Hanseníase, sendo os países Índia e Indonésia os de maiores números de diagnósticos na região. Já o Brasil, contribuiu com 93% dos casos novos na América. Esses três países juntos representam 79,6% dos novos casos de Hanseníase no mundo, em 2018.¹³

Em 2019, foram relatados 202.256 casos novos da doença no mundo, desses 29.936 (93%) ocorreram nas Américas e 27.864 foram notificados no Brasil. Além disso, 3.897 recidivas foram relatadas por 54 países – 44% delas notificadas no Brasil. Com isso, o Brasil é considerado um país de alta carga para a doença, de acordo com a OMS, em 2020.³²

A pesquisa e identificação de BAAR dão-se através dos dois métodos de coloração propostos nesse estudo: Ziehl-Neelsen e Auramina O; sendo o primeiro, adotado no Brasil para detecção de BAAR sugestivo de *Mycobacterium leprae*.³³ Porém, alguns estudos mostram resultados em que a microscopia de fluorescência por Auramina O foi considerada mais

sensível em pacientes paucibacilares e menor tempo de leitura, considerando utilização de lentes de menor aumento e contraste fluorescente no campo microscópico.³⁴⁻³⁵

Bathia³⁴ *et al.* ressaltaram a importância da técnica de coloração por Auramina O quando há escassez de bacilos. Os casos paucibacilares em biópsias cutâneas negativas coradas pelo método de Ziehl-Neelsen apresentaram positividade pelo método de Auramina O nesse estudo. A confirmação diagnóstica da Hanseníase continua sendo um grande desafio nos casos paucibacilares.

A grande maioria dos trabalhos relacionados à coloração por fluorescência na pesquisa de *M. leprae* foi realizada nas décadas de 80 e 90. Muito pouco se fala hoje sobre esse tipo de coloração, talvez por um grande fator limitante: o custo e a disponibilidade do microscópio fluorescente no atual cenário com poucos recursos financeiros para pesquisa. Porém, muitos pesquisadores concluíram em seus trabalhos que regiões com alta carga bacilar da doença, esse método de coloração ainda é o mais rápido.

Há poucos estudos comparando-se as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O a partir de esfregaços de raspado dérmico. Prendes³⁶ *et al.* sugeriram superioridade do método fluorescente pela maior rapidez e facilidade da técnica e da leitura. Martins³⁷ *et al.* obtiveram resultados de maior eficácia do método fluorescente na determinação de Índice Baciloscópico (IB) e clareza na visualização dos bacilos íntegros. Em contrapartida, Hardas e Lele³⁸ observaram melhores resultados na técnica de Ziehl-Neelsen que detectou bacilos granulados e quebrados que não foram reconhecidos pela dificuldade na sua diferenciação com artefatos no método por fluorescência e aumento da probabilidade de resultados falso-positivos.

Um estudo publicado sobre coloração no diagnóstico da Hanseníase, do autor Deepa Adiga³⁵, comparou a eficácia de três métodos de coloração em biópsias de tecidos, sendo: Ziehl-Neelsen (ZN), Fite-Faraco (FF) e Auramina O. Dentre os resultados do estudo podemos destacar que nos casos de Hanseníase indeterminada, a positividade pela coloração fluorescente foi significativamente mais positiva do que as colorações de ZN ou FF. O autor concluiu com seu trabalho, que o método fluorescente em tecidos é mais sensível na detecção de bacilos de Hansen nos casos com baixa carga bacilar. Essa coloração mostrou 100% de sensibilidade em relação ao ZN, que mostrou apenas 75% de sensibilidade em comparação com o método FF.

Alguns autores recomendam a técnica de microscopia de fluorescência como método de *Screening* (triagem), selecionando os esfregaços positivos e confirmando através da técnica de Ziehl-Neelsen.²²

No Brasil, Lyon³⁹ *et al.* pesquisaram a associação entre a baciloscopia de raspado dérmico e o Teste ML Flow, resultando esse em 70% de positividade contra apenas 40% de

positividade pela baciloscopia nos pacientes avaliados. Evidenciou-se que o Teste ML Flow foi 100% positivo nos casos com baciloscopia positiva, concluindo o estudo que os dois testes juntos podem auxiliar na classificação da doença para fins de tratamento.

Contin e colaboradores⁴⁰ também relacionaram o ML Flow à baciloscopia em um estudo retrospectivo avaliando pacientes virgens de tratamento, classificados em PB ou MB e submetidos à baciloscopia e o teste de ML Flow. Nos MB, a baciloscopia foi positiva em 80% dos casos, o ML Flow foi positivo em 82,5%. Entre os PB, o ML Flow foi positivo em 37,5% e a baciloscopia do esfregaço foi negativa em 100% dos casos. A concordância entre os resultados da baciloscopia do esfregaço e ML Flow foi de 87,5%. Concluíram que o ML Flow é um teste rápido, de fácil manuseio em campo, menos invasivo que a baciloscopia, podendo ser útil para auxiliar na decisão terapêutica em locais de difícil acesso a serviços de referência.

Segundo Bühner-Sékula⁴¹, a presença de anti-PGL-1, do tipo IgM, apresenta maior positividade nos pacientes com carga bacilar elevada. Os níveis de anticorpos diminuem na maioria dos pacientes em tratamento, podendo assim o teste permanecer positivo por anos após a cura, essa diminuição ocorre paralelamente a diminuição do Índice Baciloscópico, porém, os níveis de anticorpos podem aumentar significativamente nos casos de recidiva da doença. Portanto, a sorologia não pode ser usada como única ferramenta para distinguir uma infecção passada de uma atual, será necessária avaliação clínica com associação de outros exames para definir um caso de Hanseníase.

Diante desse quadro epidemiológico da doença no país, acreditamos que o diagnóstico clínico associado ao diagnóstico laboratorial é a grande aposta para a eliminação da doença. A introdução de pesquisas e novas técnicas laboratoriais, como teste sorológico ML Flow de fácil execução e resultado rápido, devem ser avaliadas e estudadas para a aplicação na rotina em determinadas regiões, em especial, onde o percentual de casos multibacilares ainda é relevante para diminuir a cadeia de transmissão.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as técnicas de coloração para baciloscopia de raspado intradérmico por Ziehl-Neelsen e Auramina O, associando-se com os resultados do teste de fluxo lateral ML Flow para verificar a contribuição destes no diagnóstico e classificação clínica da Hanseníase.

2.2 Objetivos Específicos

- Traçar o perfil epidemiológico e clínico dos pacientes diagnosticados.
- Comparar os resultados da leitura baciloscópica entre as técnicas de coloração por Auramina O e Ziehl-Neelsen.
- Associar os resultados das duas técnicas de coloração com o resultado do teste ML Flow.
- Verificar a soropositividade do teste ML Flow, avaliando sua relevância no controle epidemiológico.
- Avaliar o acréscimo da positividade do teste ML Flow em relação à baciloscopia.
- Verificar a presença da cicatriz da vacina BCG, número de lesões e nervos acometidos nos casos positivos pela baciloscopia e ML Flow.

3. MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz conforme CAAE nº 33756720.2.0000.0059 e Parecer nº 4.245.079 (Anexo A). Foram utilizadas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos contidas na Resolução 466/12 “Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo seres humanos”.

3.2 Delineamentos do Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo e exploratório, com coleta de dados e materiais biológicos realizado em pacientes com suspeita de Hanseníase antes de iniciar o tratamento medicamentoso e em pacientes suspeitos de recidiva da doença com cura por alta há mais de cinco anos, visando analisar a concordância entre os resultados dos testes ML Flow e da baciloscopia por duas técnicas diferentes de coloração.

O estudo foi divulgado e oferecido aos municípios em que o Instituto Adolfo Lutz – CLR de São José do Rio Preto (IAL-SJRP) é referência para baciloscopia de Hanseníase, pertencentes ao Grupo de Vigilância Epidemiológica 29 (GVE-29). No âmbito regional dos 48 municípios para os quais o IAL-SJRP é referência para baciloscopia de Hanseníase, inclusive São José do Rio Preto; 20 municípios ainda apresentam coeficiente de detecção e prevalência acima do recomendado, com detecção de 14,61/100.000 habitantes e a prevalência de 1,59/10.000 habitantes⁴², sendo que a prevalência recomendada pela Organização Mundial da Saúde é $<1 / 10.000$ habitantes.¹⁸ O maior município da região selecionada (São José do Rio Preto - SP) apresenta detecção de 5,77/100.000 habitantes considerada média pelo Ministério da Saúde (MS) e prevalência de 0,80/10.000.⁴²

3.3 População e período de estudo

O estudo foi realizado no período entre agosto de 2020 a maio de 2021 com os pacientes suspeitos de casos novos de Hanseníase e casos suspeitos de recidivas que estavam em alta por cura há mais de cinco anos, encaminhados pelos municípios da região selecionada ao Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz – CLR de São José do Rio Preto.

Participaram da pesquisa 10 municípios da região selecionada de forma voluntária e enviaram os materiais exigidos para o estudo, com os seguintes números de pacientes: São José do Rio Preto (42), Ubarana (18), Mirassol (13), Adolfo (6), Parisi (6), Nova Granada (3), Paulo de Faria (2), Potirendaba (2), Poloni (1) e Ibirá (1), totalizando 94 pacientes.

As variáveis analisadas nesse estudo dos casos diagnosticados como hanseníase foram: gênero, idade, grau de escolaridade, renda familiar, presença de comorbidades, contato direto com portador de hanseníase, número de lesões de pele, número de nervos acometidos, grau de incapacidade física, presença e número de cicatrizes da vacina BCG, teste sorológico ML Flow, baciloscopia por Ziehl-Neelsen e Auramina O.

3.4 Procedimentos para coleta de dados e amostras biológicas

Participaram da pesquisa os pacientes de demanda espontânea atendidos nas unidades de saúde com suspeita de Hanseníase, após avaliação clínica e exames dermatológicos e os pacientes suspeitos de casos de recidiva, onde foi solicitado pelo médico o exame de baciloscopia. Após a leitura da Carta de Esclarecimento sobre a pesquisa, os que consentiram em participar do estudo de forma voluntária, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A). Foi preservado o sigilo de identidade de todos os participantes da pesquisa.

No momento do atendimento, foi coletada uma lâmina de raspado intradérmico contendo quatro esfregaços para o exame de baciloscopia, além de uma amostra de sangue do paciente para o teste sorológico ML Flow. A coleta dos materiais biológicos, raspado intradérmico e sangue, foram realizados pelos profissionais capacitados no local de serviço de cada município e foi de responsabilidade da unidade de saúde.

Para a baciloscopia foram realizados os métodos de coleta preconizada pelo Guia de Procedimentos Técnicos – Baciloscopia em Hanseníase.³³ A coleta do raspado intradérmico de cada paciente foi realizada em lâminas para microscopia com extremidade fosca, contendo as iniciais do nome do paciente. Foram coletados quatro locais na lâmina na seguinte ordem: lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e cotovelo esquerdo (CE), em pacientes que não apresentavam lesões ativas visíveis, conforme figura:

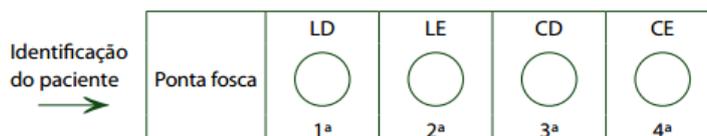


Figura 1. Local de coleta em pacientes com ausência de lesões. Ministério da Saúde, 2010.

Em pacientes com lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade, a coleta foi realizada na seguinte ordem: lóbulo auricular direito (LD), lóbulo auricular esquerdo (LE), cotovelo direito (CD) e lesão (L), conforme figura:

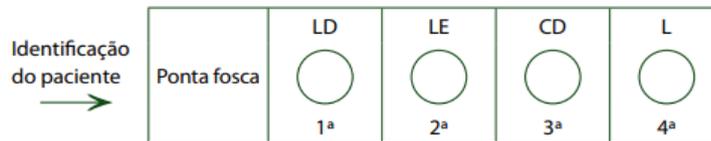


Figura 2. Local de coleta em pacientes com presença de lesões. Ministério da Saúde, 2010.

Após a coleta dos raspados intradérmicos, os esfregaços foram fixados rapidamente de duas a três vezes em chama de Bico de Bunsen. A lâmina fixada e identificada foi encaminhada juntamente com a Guia de Solicitação de Baciloscopia de Raspado Intradérmico (Apêndice B) e transportadas em porta lâminas de plástico rígido identificados com nome do paciente.

Para o teste sorológico ML Flow, foi coletado no momento do atendimento uma amostra de 5 mL de sangue do paciente por meio de punção venosa para obtenção do soro em tubo à vácuo com gel separador (Vacutainer®) sem anticoagulante. Após a coleta, o tubo foi mantido em posição vertical por 30 minutos em temperatura ambiente para evitar hemólise e formação de fibrina. As amostras de sangue que não puderam ser enviadas ao laboratório no mesmo dia da coleta foram mantidas refrigeradas até o envio no máximo por 24 horas. Os tubos de sangue foram transportados em posição vertical em caixa térmica rígida com gelo reciclável.

As amostras de sangue para o Teste ML FLOW foram enviadas juntamente com as lâminas de raspado intradérmico para baciloscopia que a unidade de saúde já envia para o laboratório rotineiramente, de acordo com protocolo já estabelecido e com o TCLE assinado pelo paciente, ao Instituto Adolfo Lutz – CLR de São José do Rio Preto.

Após a realização dos testes no laboratório de Micobactérias do IAL-SJRP, as unidades de saúde foram informadas pela pesquisadora responsável sobre os resultados dos exames em até 72 horas do recebimento do material, por meio de contato telefônico ou correio eletrônico (*e-mail*). Os resultados positivos de um ou ambos os exames laboratoriais (baciloscopias e ML Flow) e os casos confirmados clinicamente pela equipe médica, foram convocados para o retorno nas unidades de saúde para aplicação dos formulários de entrevista (Apêndices C e D) e a realização da Avaliação Neurológica Simplificada (Apêndice E), realizada por profissional capacitado no atendimento, conforme fluxograma abaixo:

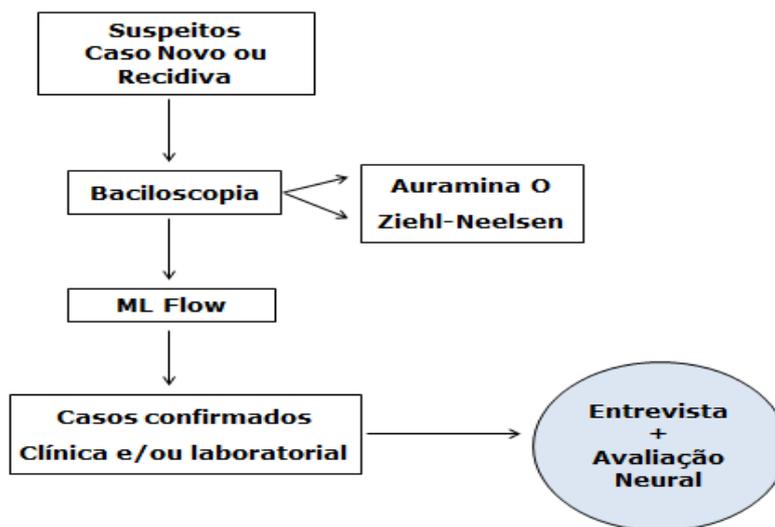


Figura 3. Fluxograma para coleta de dados e amostras biológicas.

*Nota: Entrevista e Avaliação Neural Simplificada foram realizadas somente para os casos confirmados de Hanseníase.

Os dados epidemiológicos e clínicos não contemplados nos Apêndices C e D foram pesquisados no prontuário do paciente e no sistema GAL (Gerenciador de Ambiente Laboratorial).

Os formulários da entrevista e ficha da Avaliação Neural Simplificada foram enviados para a pesquisadora pelas unidades de saúde dos municípios, por correio eletrônico (*e-mail*) ou cópia impressa.

3.5 Métodos Laboratoriais

3.5.1 Teste ML Flow

O ML Flow, desenvolvido, em 2003, por Bühner-Sékula⁴¹ na Holanda, é um teste imunocromatográfico, simples, de baixo custo e fácil execução. Atualmente, o teste não é comercializado para o uso em rotina dos serviços de saúde por não possuir registro na ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), mas é liberado para utilização em pesquisas científicas.

É um teste capaz de detectar anticorpos IgM no soro ou sangue humano, contra o glicolípido fenólico-I do *Mycobacterium leprae*, e auxiliar também na classificação das formas clínicas de Hanseníase em pacientes paucibacilares e multibacilares para fins de tratamento.^{39,41} A presença de anticorpos IgM contra PGL-I do *Mycobacterium leprae* sugere a presença de uma infecção bacilar, sendo que 15 a 40% de casos paucibacilares são positivos para o IgM

anti-PGL-I, contra 80 a 100% dos casos multibacilares.⁴³ O teste possui uma plataforma contendo duas fitas: uma com anticorpo e outra com o antígeno semissintético (linha teste) e outra com IgM humana. De acordo com Bühner-Sékula⁴¹ *et al*, deve-se adicionar amostra de sangue total ou soro no receptáculo do dispositivo e uma solução de líquido de tamponamento. Após dez minutos, obtêm-se o resultado através da leitura. O resultado é considerado válido se a linha controle estiver claramente visível. Uma linha vermelha se cora na zona de teste caso a amostra seja positiva para anticorpos IgM anti-PGL-I e o resultado é negativo considerando a ausência de coloração desta linha.

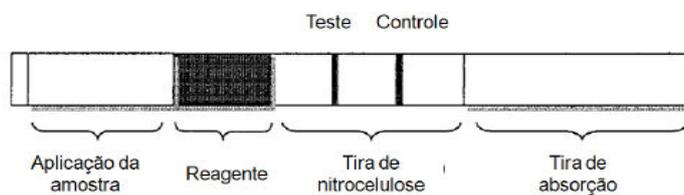


Figura 4. Plataforma do Teste ML Flow. Adaptado de Bühner-Sékula *et al*⁴¹

O teste ML FLOW utilizado nesta pesquisa foi produzido pelo Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, sob coordenação da Profa. Dra. Samira Bühner Sékula.

Para obtenção do soro foi realizada a coleta de 5 mL de sangue venoso periférico por punção venosa com tubo em vácuo com gel separador (Vacutainer®) sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas no laboratório do IAL-SJRP por 15 minutos a 3000 RPM (rotações por minuto). Durante a centrifugação, a barreira de gel move-se para cima posicionando-se entre o soro e o coágulo, formando uma barreira estável, separando o soro de outros componentes celulares. As amostras de soro foram separadas utilizando pipeta de transferência para os tubos de polipropileno 14x55 mm do tipo KMA e realizado o teste imediatamente. As amostras finalizadas foram estocadas em freezer -20°C no Setor de Micobactérias do IAL-SJRP.

O procedimento do teste foi realizado de acordo com o método descrito pelo fabricante, a seguir:

1. Remova o dispositivo ML Flow do pacote e o coloque na mesa com a janela virada para cima.
2. Pingue 5 µl de soro ou sangue total heparinizado no suporte de papel do receptáculo redondo de amostras.

3. Adicione três gotas ou 125 µl de líquido de tamponamento ao receptáculo redondo de amostras.
4. Será possível visualizar um fluido de cor de rubi movendo-se através das zonas de teste e controle.
5. Leia os resultados após cinco minutos quando usar sangue total ou após 10 minutos quando usar soro.
6. Os resultados mantêm-se estáveis por mais 15 minutos. Não execute leitura do teste após 20 minutos.

Interpretação dos resultados dos testes:

- ✓ Um resultado negativo é indicado pela ausência de uma linha na zona de teste e pela presença de uma linha na zona de controle.
- ✓ Um resultado positivo é indicado pela presença de duas linhas: uma linha definida na zona de teste e outra linha na zona de controle.

3.5.2 Coloração por Auramina O

As micobactérias são evidenciáveis com segurança por métodos especiais, tais como, o de Ziehl-Neelsen e a coloração pela Auramina O. Este corante é classificado como fluorocromo, substância orgânica que ao ser excitado por luz de comprimento de onda determinado, emite luz de comprimento maior. As micobactérias, uma vez coradas pelos fluorocromos, não se deixam descorar pela ação do álcool-ácido. De acordo com Ministério da Saúde³³, os esfregaços devem ser corados primeiramente por Auramina O, e após a leitura por fluorescência, deverão ser recorados por Ziehl-Neelsen. Os insumos necessários para essa coloração foram preparados no setor de Meios de Culturas localizado no IAL-SJRP. Técnica para a preparação dos insumos e coloração foi realizado de acordo com o Guia de Procedimentos Técnicos – Baciloscopia em Hanseníase³³:

Solução de Auramina fenicada (solução A)

Auramina O _____ 1g

Álcool etílico a 95% PA _____ 100ml

- ✓ Dissolver 1g de Auramina O em 100 ml de álcool. Juntar 900 ml de fenol aquoso (solução B). Agitar. Guardar em frasco escuro na geladeira, pois a Auramina é inativada pelo calor. Evitar o contato com a pele, pois tem poder cancerígeno.

Solução de fenol aquoso (solução B)

Fenol cristalizado _____ 30 g

Água destilada _____ 870 ml

- ✓ Aquecer em banho-maria até a completa dissolução do fenol. Deixar esfriar à temperatura ambiente.

Solução de permanganato de potássio a 0,5%

Permanganato de potássio _____ 5g

Água destilada _____ 1000 ml

- ✓ Dissolver o permanganato de potássio na água destilada. Estocar em frasco âmbar e à temperatura ambiente.

Solução descorante

Ácido clorídrico PA _____ 5ml

Álcool etílico a 70% _____ 1000 ml

- ✓ Com uma pipeta, deixar escorrer o ácido clorídrico pelas paredes do frasco contendo o álcool e agitar suavemente. Armazenar à temperatura ambiente.

Para a técnica de Coloração por Auramina O, foram seguidos os seguintes passos:

1. Colocar a lâmina já fixada sobre o suporte para coloração com o lado dos esfregaços voltado para cima.
2. Cobrir os esfregaços com a solução de Auramina O fenicada.
3. Deixar à temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Lavar o esfregaço com água destilada. Não usar água corrente, pois o cloro pode interferir na fluorescência.
5. Descorar com álcool-ácido por dois minutos.
6. Lavar o esfregaço novamente com água destilada.
7. Cobrir o esfregaço com solução de permanganato de potássio por dois minutos.
8. Deixar secar à temperatura ambiente em local escuro.

Todas as lâminas nessa etapa foram examinadas no microscópio por fluorescência dentro de 24 horas, após a coloração.

3.5.3 Coloração por Ziehl-Neelsen

As micobactérias não se coram pelo método do Gram, mas são evidenciáveis com segurança por métodos especiais, como o de Ziehl-Neelsen, que induz à penetração da carbolfucsina na parede celular. Os bacilos tornam-se avermelhados e retêm a cor mesmo após descoloração com mistura de álcool e ácido, bactérias essas denominadas de bacilos álcool-ácidos-resistentes. A contra coloração, usualmente com azul de metileno, faz com que o restante do esfregaço fique azul. Os corantes usados para essa técnica foram de kits comerciais disponíveis para coloração de Ziehl-Neelsen em laboratórios.

Para este estudo, foi escolhida a técnica para a coloração a frio, de acordo com o Guia de Procedimentos Técnicos – Baciloscopia em Hanseníase³³:

1. Colocar a lâmina já fixada sobre o suporte para coloração com o lado dos esfregaços voltados para cima.
2. Cobrir os esfregaços com a solução de fucsina filtrada.
3. Deixar à temperatura ambiente durante 20 minutos.
4. Lavar a lâmina com água corrente inclinando-a para remover o excesso.
5. Gotejar a solução álcool-ácida 1% sobre a lâmina, até que esta fique limpa.
6. Lavar com água corrente e inclinar a lâmina para remover o excesso.
7. Cobrir com a solução de azul de metileno durante um minuto.
8. Lavar em água corrente de baixa pressão.
9. Deixar secar a temperatura ambiente.
10. Examinar ao microscópio com objetiva de imersão.

3.5.4 Leitura Microscópica

Para a microscopia, as duas técnicas necessitam de equipamentos distintos.

Na coloração por Ziehl-Neelsen foi utilizado microscópio óptico comum, marca Olympus, modelo CX31, binocular, na objetiva de imersão 100x para o cálculo de Índice Baciloscópico. Para coloração por Auramina O, foi utilizado microscópio próprio para leitura fluorescente, marca Nikon, modelo Labophot-2, binocular, utilizando-se a objetiva de 10x, em seguida de 40x, e quando detectou presença de bacilos fluorescentes selecionou-se a objetiva de 100x. A leitura deve ser feita no mínimo em 100 campos nas duas técnicas propostas.

Pela técnica de microscopia fluorescente, a leitura é qualitativa, sendo resultado positivo quando há presença de um ou mais bacilos fluorescentes ou negativo quando há ausência de bacilos fluorescentes na lâmina analisada.

Na leitura pela técnica de Ziehl-Neelsen são contados todos os bacilos encontrados isolados, agrupados ou em globias, observados em cada campo microscópico. O número de bacilos contados em cada campo foi anotado em folha de contagem e, após o término da leitura, foi realizada a soma de todos os bacilos encontrados, dividindo-se pelo número de campos microscópicos analisados. Essa média de bacilos será o Índice Baciloscópio do esfregaço. O resultado é expresso conforme a escala logarítmica de Ridley, variando de 0 a 6+. Todos os resultados foram registrados em planilha *Excel*.

3.6 Avaliação Neurológica Simplificada (ANS)

O Ministério da Saúde adota nacionalmente um protocolo para a Avaliação Neurológica Simplificada (Apêndice E). É fundamental realizar essa avaliação da integridade da função neural e do grau de incapacidade física de todos os pacientes no momento do diagnóstico, sempre que houver queixas de sinais e sintomas e no término da poliquimioterapia.^{8,44} Neste estudo, a ANS foi realizada por profissional capacitado presente na unidade de saúde, sendo fisioterapeuta ou terapeuta ocupacional.

Para o teste de sensibilidade foi utilizado o conjunto de monofilamentos de Semmes-Weinstein (6 monofilamentos), nos pontos de avaliação de sensibilidade em mãos e pés e do fio dental (sem sabor) nos olhos. Para avaliação de força motora foi utilizado o teste manual de exploração da força muscular, capacidades de oposição à força da gravidade e resistência manual referente a um nervo específico, conforme preconizado. Os critérios de graduação da força muscular podem ser expressos com graduação de zero a cinco ou como: forte, diminuída ou paralisada, segundo o Ministério da Saúde.⁸

3.7 Critérios Inclusão

- a) Casos suspeitos de Hanseníase atendidos por demanda espontânea e pacientes suspeitos de recidiva da doença em alta do tratamento há mais de cinco anos, atendidos nas unidades básicas de saúde dos municípios da região selecionada, no período compreendido entre agosto de 2020 a maio de 2021;
- b) Todos os casos que consentiram em participar do estudo; assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.8 Critérios de Exclusão

- a) Lâmina de baciloscopia recebida quebrada;

- b) Coleta de sangue em tubo inadequado para a obtenção de soro;
- c) Pacientes que não retornaram na consulta para realização da ANS e aplicação dos questionários.

3.9 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram organizados em planilhas pelo programa *Excel* 2013 da Microsoft, para agrupamento das variáveis de estudo. Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico EPI INFO 7.1.2.0 Software (Atlanta, Georgia, EUA) para obtenção da distribuição da frequência, média e desvio padrão das variáveis de interesse. Para verificar associação entre as variáveis, foram considerados significantes os valores de $p \leq 0,05$. Para avaliação da concordância entre os métodos foi estimado o Índice de Kappa, e para a interpretação deste índice, foram utilizados os critérios de Landis & Koch.

4. RESULTADOS

Participaram do estudo o total de 94 pacientes com suspeita de Hanseníase, atendidos por demanda espontânea nas unidades de saúde dos municípios da região selecionada. Todos participantes foram avaliados clinicamente pela equipe médica da unidade e realizaram os exames de baciloscopia e ML Flow.

Tabela 1. Perfil dos 94 participantes do estudo e resultados dos exames laboratoriais no período de agosto de 2020 a maio de 2021.

Variáveis		n	%
Gênero	Masculino	50	53,2
	Feminino	44	46,8
Idade	< 18 anos	-	-
	18 – 30 anos	6	6,4
	31 – 45 anos	24	25,8
	46 – 60 anos	25	26,8
	> 60 anos	39	41,0
Cor	Branco	52	55,3
	Pardo	19	20,2
	Negro	4	4,2
	Amarelo	1	1,0
	Não informado	18	19,3
Caso Suspeito	Caso Novo	83	88,3
	Recidiva	11	11,7
Auramina O	Positivo	15	16,0
	Negativo	79	84,0
Ziehl-Neelsen	Positivo	21	22,4
	Negativo	73	77,6
ML Flow	Positivo	27	28,7
	Negativo	67	71,3

Dentre a análise do perfil de todos os 94 participantes do estudo, a média de idade foi de 53,6 anos (DP= 16,08) com variação entre 18 a 85 anos e com predomínio do gênero masculino (53,2%). A positividade do teste ML Flow foi maior observada em 28,7% dos pacientes, seguidos de baciloscopia positiva por Ziehl-Neelsen e Auramina O no total dos pacientes avaliados.

Desses participantes, 31 (32,9%) receberam o diagnóstico de Hanseníase (sendo 22 casos novos e nove casos suspeitos de recidiva), realizaram ANS, entrevistas dos questionários e entraram para as análises propostas neste estudo.

No estudo, entre os 31 pacientes diagnosticados com hanseníase, houve predominância do gênero masculino (58,0%), maiores de 60 anos (45,2%) de idade e ensino fundamental incompleto (45,1%). Em 51,6% (n=16) dos casos entrevistados, a renda familiar era de até dois salários mínimos.

Em relação ao histórico de comorbidades, foi proporcionalmente maior o número de hipertensos (42,0%) em relação aos diabéticos (25,8%). Foram relatadas nos questionários outras comorbidades como depressão, arritmia cardíaca e hipotireoidismo. Nenhum paciente estava fazendo uso de medicação para hanseníase, porém, 11 (35,4%) já haviam realizado tratamento há mais de cinco anos e foram considerados casos suspeitos de recidivas. Desses, nove (81,8%) receberam o diagnóstico e foram considerados caso suspeito de recidiva.

Foi relatado o início do quadro clínico em 77,4% (n=24) como manchas anestésicas, 61,2% (n=19) dormência e 22,5% (n=7) perda de força. Contato direto com algum familiar diagnosticado com Hanseníase foi relatado na maioria dos pacientes, sendo cônjuge (n=5), filhos (n=4) e irmãos (n=4) os contatos mais citados respectivamente.

Foram diagnosticados quatro (12,9%) casos paucibacilares e 27 (87,0%) casos multibacilares. Nos 22 casos novos de hanseníase diagnosticados, a forma clínica que mais prevaleceu foi dimorfa em 10 (45,4%) pacientes e dos nove casos suspeitos de recidiva, a forma clínica mais presente foi virchowiana em sete (77,7%) pacientes. Não houve diagnóstico da forma indeterminada nos pacientes avaliados. Foram identificados 74,2% (n=23) de pacientes com grau de incapacidade física, sendo o grau 1 o mais presente.

Tabela 2 - Concordância entre as baciloscopias e o teste sorológico ML Flow dos 94 pacientes avaliados.

	Ziehl-Neelsen		Auramina O		Total	*Valor -p	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo			
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)		
ML FLOW	Positivo	19 (90,5)	08 (11,0)	14 (93,3)	13 (16,5)	27 (28,7)	<0,05
	Negativo	02 (9,5)	65 (89,0)	01 (6,7)	66 (83,5)	67 (71,3)	
TOTAL	21 (100,0)	73 (100,0)	15 (100,0)	79 (100,0)	94 (100,0)		
Índice Kappa	0,72		0,58				
	IC a 95%= 0,56 - 0,88		IC a 95%= 0,39 - 0,76				

*Valor -p= <0,05 (Fisher's test); IC= intervalo de confiança.

Observou-se concordância moderada entre os resultados dos testes ML Flow e baciloscopia por Auramina O (Kappa= 0,58), e substancial entre o ML Flow e a baciloscopia por Ziehl-Neelsen (Kappa= 0,72), de acordo com os critérios de Landis & Koch. Foi observado que 27 pacientes apresentaram sorologia positiva, enquanto 21 e 15 apresentaram resultados positivos de baciloscopia ZN e Auramina O, respectivamente. Foi observado que oito (11,0%) pacientes com baciloscopia ZN negativa apresentaram sorologia positiva, enquanto dois (9,5%) pacientes apresentaram baciloscopia ZN positiva (IB abaixo de 1,0) com sorologia negativa, sendo esses dois pacientes casos suspeitos de recidivas e que já trataram a doença há mais de cinco anos.

Tabela 3. Distribuição dos resultados do teste ML FLOW, segundo o Índice Baciloscópico (ZN) dos pacientes avaliados no estudo.

Índice Baciloscópico (ZN)	ML Flow (+)		ML Flow (-)	
	n	%	n	%
0,0	8	29,6	65	97,0
0,1 – 0,9	8	29,6	2	3,0
1,0 – 1,9	8	29,6	0	0,0
2,0 – 2,9	3	11,2	0	0,0
3,0 – 3,9	0	0,0	0	0,0
4,0 – 4,9	0	0,0	0	0,0
5,0 – 6,0	0	0,0	0	0,0
Total	27	100,0	67	100,0

ML Flow (+): IB médio 0,77 (DP 0,81)

ML Flow (-): IB médio 0,01 (DP 0,10)

Foram associados os resultados do teste ML Flow ao Índice Baciloscópico de Ziehl-Neelsen, conforme apresentado na Tabela 3. Dos 94 pacientes avaliados, 73 (77,6%) apresentaram IB negativo. Houve predomínio do IB entre 0,0 a 1,9 sendo que três (11,2%) pacientes apresentaram IB acima de 2,0. Dois pacientes tiveram teste sorológico negativo com IB entre 0,1 a 0,9. Não houve IB maior ou igual a 3,0. O estudo apontou que o resultado do teste ML Flow está associado à baciloscopia e que mesmo os pacientes que tiveram IB baixo apresentaram resultados positivos para o teste sorológico. O teste ML FLOW teve maior positividade tendo em vista haver seis casos a mais quando comparados ao resultado da baciloscopia.

Tabela 4. Concordância dos resultados entre as técnicas de baciloscopia de Ziehl-Neelsen e Auramina O dos 94 participantes

		ZIEHL-NEELEN					
		Positivo		Negativo		Total	
		n	%	n	%	n	%
AURAMINA O	Positivo	15	71,5	0	0,0	15	16,0
	Negativo	6	28,5	73	100	79	84,0
	Total	21	100	73	100	94	100

Índice de Kappa= 0,79 / Valor $-p = <0,05$ (Fisher's test)

A tabela 4 apresenta os resultados obtidos entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina avaliadas. A concordância observada entre as duas técnicas de coloração foi substancial (kappa= 0,79), segundo o Índice de Kappa.

Tabela 5. Distribuição da frequência dos dados clínicos quando relacionados aos resultados positivos dos três testes laboratoriais avaliados.

		ML Flow (+)		Ziehl-Neelsen (+)		Auramina O (+)		Valor $-p$
		nº	%	nº	%	nº	%	
Nº lesões cutâneas	< 5 lesões (n=14)	14	100	9	64,2	7	50,0	> 0,05
	≥ 5 lesões (n=15)	13	86,6	12	80,0	8	53,3	
Nº nervos acometidos	< 1 nervo (n=10)	10	100	6	60,0	5	50,0	> 0,05
	≥ 1 nervo (n=19)	17	89,4	15	78,9	10	52,6	
Cicatriz BCG	Nenhuma (n=10)	10	100	4	40,0	2	20,0	> 0,05
	Uma (n=19)	17	89,4	17	89,4	13	68,4	
	Duas (n=0)	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Classificação Operacional	PB (n=4)	4	100	0	0,0	0	0,0	-
	MB (n=25)	23	92,0	21	84,0	15	60,0	
Grau de Incapacidades Físicas	0 (n=8)	7	87,5	5	62,5	4	50,0	> 0,05
	1 (n=19)	18	94,7	15	78,9	10	52,6	
	2 (n=2)	2	100	1	50,0	1	50,0	

Nota: foram avaliadas somente as variáveis clínicas dos pacientes que tiveram resultado positivo em um ou todos os testes laboratoriais (n=29).

Dos 31 pacientes diagnosticados com Hanseníase, dois casos novos foram confirmados somente pela avaliação clínica, sendo negativos nos três testes laboratoriais testados nesse estudo, conforme dados apresentados na Tabela 5. Pacientes diagnosticados como PB, apresentaram 100% de positividade para o teste ML Flow. Não houve informações nos formulários de pacientes com duas cicatrizes da vacina BCG, porém, os dez pacientes que relataram ausência da cicatriz vacinal apresentaram resultado positivo no teste sorológico. Foi notada a presença do Grau de Incapacidades Físicas 1 na maioria dos casos, sendo relacionada,

principalmente, aos resultados positivos do teste ML Flow. Grau de Incapacidades Físicas 2 foi observado em dois casos com resultado de sorologia positiva e um caso para as duas baciloscopias. Seis pacientes relataram deformidades físicas nos questionários, sendo três relatos em pés e três nas mãos.

De todos os pacientes avaliados nesse estudo, somente três realizaram exame de biópsia no período e tiveram resultado sugestivo de hanseníase. Dentre os pacientes que participaram como suspeitos de recidiva e que já trataram a doença há mais de cinco anos, foram relatados no questionário, efeitos adversos ao tratamento anterior, como: toxicidade hepática, fraqueza e boca amarga. Os sintomas atuais mais citados nos questionários aplicados foram respectivamente: parestesia, áreas ressecadas, dores generalizadas, madarose e entupimento do nariz.

5. DISCUSSÃO

Uma vez que o Brasil apresenta alta carga para Hanseníase³² a introdução de novas técnicas laboratoriais que colaborem para o diagnóstico da doença, como o teste sorológico ML Flow, devem ser avaliadas e comparadas às técnicas existentes para sua aplicação na rotina, em especial, onde o percentual de casos MB ainda é relevante.

Os dados epidemiológicos encontrados em nosso estudo estão em consonância com a literatura no que se refere ao gênero masculino^{39,45}, mas diferem em relação à média de idade que foi acima dos dados relatados por outros autores que encontraram acometimento pela Hanseníase na fase adulta mais economicamente ativa⁴⁵⁻⁴⁶, sugerindo a hipótese de provável diagnóstico tardio.

A baixa escolaridade e renda familiar abaixo de dois salários mínimos são achados similares com dados encontrados em outros estudos⁴⁷⁻⁴⁸ e refletem a precariedade socioeconômica que favorece a disseminação da doença, sugerindo a Hanseníase ser um agravo associado a fatores socioculturais⁴⁹⁻⁵⁰, o que pode resultar na falta de compreensão da doença e na alta taxa de casos de abandono da poliquimioterapia.⁵¹

A cadeia de transmissão da doença pela suscetibilidade genética considera que contatos domiciliares consanguíneos têm maior risco de adoecer⁵¹⁻⁵², fato que corrobora com nosso estudo em que uma parte dos participantes declara contato direto com algum familiar já diagnosticado com Hanseníase, sendo cônjuge e filhos os mais citados, respectivamente.

As formas clínicas que mais prevaleceram foram dimorfa e virchowiana (multibacilares), dados já confirmados em pesquisas anteriormente publicadas, que atestam a Hanseníase de formas MB com mais facilidade no diagnóstico clínico e laboratorial com maiores números de casos relatados^{39,51,53-54}, sugerindo que a infecção da doença ocorra mais facilmente em indivíduos com baixa imunidade ou a hipótese da falha no diagnóstico inicial pelos serviços de saúde.

A despeito dos avanços laboratoriais, mesmo sem existir um exame considerado padrão-ouro no diagnóstico da Hanseníase, os testes laboratoriais têm sido de grande utilidade no auxílio para a classificação dos pacientes, todavia, muitos exames não estão disponíveis na maior parte dos serviços de saúde. De acordo com o Ministério da Saúde¹⁹, o exame dermatoneurológico e a baciloscopia positiva ainda são considerados soberanos para a definição do diagnóstico da Hanseníase, porém, nenhum teste laboratorial isoladamente é considerado 100% sensível e específico para a correta classificação clínica da doença.¹⁹⁻³²

O ML Flow é um teste sorológico, simples e rápido, que detecta carga bacilar e pode auxiliar na classificação das formas clínicas de Hanseníase em pacientes PB e MB para fins de tratamento.⁴¹ Neste estudo, a positividade do teste ML Flow ocorreu em 85,2% dos pacientes classificados como MB, achado condizente com trabalhos realizados no Brasil que descreveram a soropositividade entre 50,8% a 94,2%^{39-40,53} nas formas multibacilares. Pesquisas descreveram que a maioria dos pacientes classificados como MB possui altos níveis de anticorpo IgM anti-PGL-I e sorologia fortemente positiva, diferente dos pacientes classificados como PB que geralmente apresentam sorologia negativa.⁴¹ Embora estudos cite sensibilidade de 40% do teste nos casos PB^{40,43}, nossos resultados detectaram sorologia positiva em 100% dos pacientes classificados como PB. Porém, vale ressaltar que o teste ML Flow não é recomendado como único teste no diagnóstico, pois a maioria dos casos PB podem não desenvolver os anticorpos detectáveis na sorologia.^{26,40-41} Os quatro (4) pacientes PB foram classificados por apresentarem até cinco lesões de pele com áreas anestésicas, além de relatarem nos questionários ter contato direto com portadores da doença.

Dos pacientes suspeitos de recidivas avaliados nessa pesquisa, 77,7% tiveram resultados positivos para sorologia. Foi descrito por outros autores que os níveis de anticorpos IgM contra o PGL-I, tendem a decrescer em pacientes durante o tratamento medicamentoso^{39,55}, porém, têm sido feitas associações com o aumento significativo de anti-PGL-I em casos de reações pós alta ou em riscos de recidivas. De acordo com a pesquisa realizada por Brito e colaboradores⁵⁶, existem fatores de riscos em comum entre a reação pós alta e a recidiva que podem ser confundidos e, portanto, são necessários mais estudos para determinar marcadores clínicos e testes laboratoriais mais precisos para diferenciar o diagnóstico entre as duas situações.

A técnica de coloração por Ziehl-Neelsen é considerada método de referência na detecção de BAAR¹⁹, contudo, a técnica apresenta baixa sensibilidade e exige tempo para o preparo dos esfregaços e leitura, o que dificulta a análise de grande número de amostras. Nesse ponto, a técnica de microscopia de fluorescência como a Auramina O, utilizada neste estudo, apresenta algumas vantagens como em relação ao menor tempo de leitura e à facilidade na detecção de bacilos pelo contraste dos mesmos fluorescentes contra o fundo escuro.^{34,38,45}

Ao contrário da coloração de Ziehl-Neelsen recomendada pelo MS, a leitura por fluorescência pela técnica de Auramina O exige microscópio específico. Uma das limitações da disponibilidade dessa técnica nos serviços laboratoriais é o custo elevado do equipamento e a falta de profissionais capacitados para a leitura, sendo assim, essa técnica tem sido abandonada e muito pouco tem se falado desse tipo de coloração nos dias de hoje. Foram realizados muitos trabalhos na década de 90 sobre a leitura por fluorescência e ainda há

controvérsias quanto a sua sensibilidade e melhor aplicabilidade. Porém, o que tem sido levado em questão nos dias atuais é que em ambas técnicas para baciloscopia, o fator importante e de maior destaque é a realização de uma boa coleta do material biológico e a capacitação frequente de técnicos para a leitura baciloscópica.⁵⁸

Do ponto de vista clínico, considerando o resultando positivo ou negativo da baciloscopia para o diagnóstico e definição de esquema terapêutico, a análise realizada através do Coeficiente Kappa observou concordância substancial entre as duas técnicas de coloração no presente trabalho. Achado inferior do encontrado por Sarubi⁴⁵ que detectou entre as duas técnicas de coloração, índice de concordância excelente com Kappa, segundo os critérios de Landis & Koch.

Neste estudo, a positividade pela técnica de ZN foi superior a técnica de fluorescência com percentual de positividade ZN semelhante a outros autores, que observaram percentuais para baciloscopia de 25% a 35,9%^{39,53} e até inferior como pesquisa realizada na Índia com apenas 8,8% de positividade da baciloscopia ZN de casos novos registrado⁹, constatando a baixa sensibilidade do exame ou problemas na coleta adequada do material. A literatura ainda apresenta dados variáveis em comparação aos dois métodos analisados. Foi evidenciada anteriormente a superioridade pela microscopia de fluorescência em relação ao método ZN, em cortes histológicos de fragmentos de pele³⁴⁻³⁵ ou em raspado intradérmico.³⁶⁻³⁷ Deve ser considerada a importância de técnicos experientes na realização da leitura microscópica por fluorescência, uma vez que existe a possibilidade de artefatos no esfregaço ocasionarem resultados falso-positivos.³⁷⁻³⁸ De acordo com pesquisas anteriores, a introdução do método fluorescente na rotina laboratorial deve ocorrer inicialmente como uma triagem de esfregaços positivos ou negativos, e posteriormente, depois de familiarizado com a técnica poderá ser feito a execução do Índice Baciloscópico.³⁷

Os pacientes classificados como PB apresentaram resultados negativos para as duas técnicas de baciloscopias avaliadas. É reconhecido que nas formas PB (indeterminada ou tuberculóide), os bacilos da hanseníase dificilmente são detectados na coloração e que algumas formas clínicas apresentam baciloscopia negativa, não descartando a doença.^{19,34} A distribuição irregular dos bacilos nas lâminas de esfregaços pode ser uma das causas de variação dos resultados na contagem de bacilos quando liberado em cruces. Foi demonstrado por Bathia³⁴ que mesmo o esfregaço apresentando Índice Baciloscópico elevado, os bacilos não são distribuídos de maneira homogênea na lâmina, podendo haver campos de leitura isentos de bacilos, sendo assim, pode haver diferentes resultados em cruces quando realizada a leitura do esfregaço por diferentes profissionais, fator de limitação da técnica.

O teste ML Flow mostrou forte concordância com as duas técnicas de baciloscopias avaliadas, sendo maior a associação com ZN (Kappa= 0,72), resultado superior aos encontrados por Grossi⁵³ (Kappa= 0,48) e Lyon³⁹ (Kappa= 0,49). Esse achado evidencia que o teste sorológico pode ser um grande aliado para auxiliar na classificação clínica de pacientes PB e MB e para a definição do tratamento. Considerando que nosso trabalho detectou seis (6) pacientes soropositivos com baciloscopia negativa, que seriam classificados como PB, ou não diagnosticados se a clínica não fosse evidente, caso fosse usado somente o resultado da baciloscopia como critério. Portanto, o uso do teste ML Flow pode colaborar não só para a classificação clínica (ou operacional) e confirmar casos que poderiam ser descartados por talvez, não apresentarem uma clínica robusta. Lyon e colaboradores³⁹ sugerem em sua pesquisa que o teste sorológico por ser mais sensível que a baciloscopia, poderia detectar os verdadeiros casos MB.

Dessa forma, como não existe um teste padrão-ouro para a doença, nossos resultados apontam quão importante é a complementação do diagnóstico padrão com a sorologia para somar ou direcionar para um resultado laboratorial mais fidedigno na classificação dos casos e na escolha adequada do tratamento para o paciente.

É considerado um importante marcador de deficiências físicas o acometimento de nervos periféricos pela hanseníase.^{1,44} Neste estudo, a maioria dos pacientes diagnosticados com hanseníase apresentou um ou mais nervos comprometidos (67,7%), sendo esse achado fortemente relacionado aos resultados positivos do teste ML Flow (80,9%) e da baciloscopia pela técnica de Ziehl-Neelsen (71,4%). Apesar de a região estudada ser uma região de pós-eliminação da doença, nossos achados apontam alto Grau de Incapacidades Físicas nos casos novos, o que sugere um diagnóstico tardio da doença.

Quanto ao número de lesões cutâneas, metade (54,8%) dos pacientes apresentou cinco ou mais lesões, associando principalmente ao resultado positivo do teste ML Flow (76,4%) seguido pela positividade da baciloscopia ZN (70,5%).

Dos 11 pacientes que relataram ausência de cicatriz vacinal do Bacillus Calmette-Guérin (BCG), 81,8% tiveram sorologia positiva. Há relatos que em indivíduos não vacinados há uma tendência na elevação dos títulos de anticorpos ao PGL-I, reafirmando a vacinação como importante medida de controle da doença.^{50,57} O Brasil adota a medida de uma dose de reforço da vacina BCG em contatos domiciliares de pacientes portadores da doença. Pesquisas apontam que o reforço da imunização pode reduzir em cerca de 50% o risco de adoecimento pela hanseníase.⁵⁷

Entre os fatores limitantes do estudo, a ausência de um método laboratorial padrão-ouro para a confirmação do *Mycobacterium leprae* impossibilitou a realização de testes estatísticos para avaliação da sensibilidade e especificidade das técnicas propostas.

6. CONCLUSÕES

Diante do exposto nesse estudo, observaram-se os seguintes resultados dos testes avaliados para a sua contribuição desses no diagnóstico e classificação clínica da Hanseníase:

- Dentre os pacientes diagnosticados, houve predomínio do sexo masculino, maiores de 60 anos com ensino fundamental incompleto e baixa renda familiar. Doenças como hipertensão e diabetes foram prevalentes.
- Os achados clínicos: presença de uma cicatriz da vacina BCG, número de lesões de pele e nervos acometidos estão relacionados fortemente com os resultados positivos dos testes ML Flow e baciloscopia por Ziehl-Neelsen.
- Conclui-se que a técnica de Ziehl-Neelsen permanece como melhor opção para coloração padrão da Hanseníase quando comparado a Auramina O.
- Houve maior concordância entre o teste imunocromatográfico ML Flow com a baciloscopia por Ziehl-Neelsen quando comparados os resultados com a baciloscopia por Auramina O.
- Entre as três técnicas laboratoriais avaliadas, o teste ML Flow apresentou maior positividade e maior impacto nos resultados finais. Por ser um teste rápido e de fácil execução, pode ser uma ferramenta útil e eficaz no diagnóstico precoce de casos de Hanseníase, para ser utilizado na rotina de qualquer nível do serviço de saúde, haja vista não existir exame laboratorial padrão-ouro para Hanseníase.

REFERÊNCIAS

1. Meima A, Richardus JH, Habbema JDF. Trends in leprosy case detection Worldwide since 1985. *Lepr.Rev* [Internet]. 2004 [citado em 05 set 2019]; 75(1): 16-33. Disponível em: https://leprosyreview.org/admin/public/article_shell/uploads/article_files/Lepra/LEPR OSY/75/1/lr019033/lr019033.pdf.
2. Lombardi C. et al. História natural da hanseníase. In: Lombardi, Ferreira, Motta e Oliveira. *Hanseníase: Epidemiologia e controle*. São Paulo, Imprensa Oficial do Estado: Arquivo do Estado 1990; p.13-20.
3. Goulart IMB, Pena GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *RevSocBrasMedTrop* [Internet]. 2002 [citado em 21 set 2019]; 35(4): 365-75. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/YpsJ3XmYgL7K5vjRhDw35bq/?lang=pt>. DOI: 10.1590/S0037-86822002000400014.
4. Scollard DM et al. The continuing challenges of leprosy. *Clin.Microbiol.Rev* [Internet]. 2006 [citado em 10 dez 2019]; 19(2): 388-81. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16614253/> DOI:10.1128/CMR.19.2.338-381.2006.
5. Eichelmann K, González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani. Leprosy. An Update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *ActasDermosifiliografica* [Internet]. 2013 [citado em 21 set 2019];104(7):554-63. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23870850/> DOI: 10.1016/j.adengl.2012.03.028.
6. Lastoria JC, Abreu MAMM. Hanseníase: Diagnóstico e Tratamento. *Diagn Tratamento* [Internet]. 2012 [citado em 10 nov 2019]; 17(4): 173-9. Disponível em: <http://www.apm.org.br/imagens/Pdfs/revista-98.pdf>.
7. Talhari S, Penha GO, Gonçalves HS, Oliveira MLW. *Hanseníase*. 5º ed. DiLivros. Manaus, 2015.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes para vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico- operacional [Internet]. 2016 [citado em 08 ago 2019]. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/04/diretrizes-eliminacao-hanseniase-4fev16-web.pdf>.
9. Norman G, Joseph G, Richard J. Validity of the WHO Operational Classification and value of other clinical signs in the classification of leprosy. *Int.J.Leprot.Micobact.Dis* [Internet]. 2004 [citado em 21 set 2019]; 72(3): 278-83. Disponível em: <http://ila.ilsl.br/pdfs/v72n3a03.pdf>.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 46, 2020. [Internet]. 2020 [citado em 18 set 2021];

- 51(28). Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/media/pdf/2020/dezembro/11/boletim_epidemiologico_svs_48.pdf.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Coordenação-Geral de Hanseníase e Doenças em Eliminação. Nota Informativa nº 51, de 2015 CGHDE/DEVIT/SVS/MS [Internet]. 2015 [citado em 04 nov 2019]. Disponível em: https://www.saude.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/202004/nota_informativa_51_recidiva_resiste_insuficiencia_medicamentos_anahanseniase.pdf.
 12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde [Internet]. 2017 [citado em 04 nov 2019]. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/PDF/2017/outubro/16/Volume-Unico-2017.pdf>.
 13. OMS. Organização Mundial da Saúde. Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase [Internet]. 2019 [citado em 08 jan 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274127/9789290227076-por.pdf?sequence=47&isAllowed=y>.
 14. Rani S H et al. Cell mediated immunity in children with scar-failure following BCG vaccination. *Indian.Pediatr.* [Internet]. 1998 [citado em 08 nov 2020]; 35(2):123-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9707854/>.
 15. WHO. World Health Organization. BCG vaccines: WHO position paper – February 2018. *Weekly epidemiological record* [Internet]. 2018 [citado em 12 jan 2021] Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260306/WER9308.pdf;jsessionid=D9C18AEDD67E61AE18B45A8A8211481C?sequence=1>.
 16. WHO. World Health Organization. Towards Zero Leprosy. *Global Leprosy (Hansen's Disease) Strategy 2021–2030* [Internet]. 2021 [citado em 05 jan 2021]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340774>.
 17. Nobre ML et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS.Negl.Trop.Dis* [Internet]. 2017 [citado em 12 jan 2021];11(2). Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005364> DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005364>.
 18. WHO. World Health Organization. *Global Leprosy Strategy 2016-2020: Accelerating towards a leprosy-free world* [Internet]. 2016 [citado em 04 nov 2019]. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208824/9789290225096_en.pdf?sequence=14&isAllowed=y.
 19. Brasil. Ministério da Saúde. Guia para o controle da hanseníase. *Cadernos de Atenção Básica.* [Internet]. 2002 [citado em 10 jan 2020]. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_hanseniase.pdf.
 20. Stump PRNAG, Baccarelli R, Marciano LHSC, Lauris Jr., Teixeira MJ, Ura S, Virmond MC. Dor neuropática em pacientes com hanseníase. *Int J Lepr.* 2004; 72 : 134–8.

21. Britton WJ, Lockwood NL. Leprosy. *The Lancet* [Internet]. 2004 [citado em 10 jan 2020]; 363:1209-10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15081655/>. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15952-7.
22. Somoskövi A et al. Lessons from a proficiency-testing event for acid-fast microscopy. *Chest*. 2001; 120: 250-57. DOI: 10.1378/chest.120.1.250.
23. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J.Am.Acad. Dermatol*. 2004; 51(3): 417-26. DOI: 10.1016/j.jaad.2003.11.072.
24. Silva EA et al. Serodiagnosis of leprosy and follow-up of house hold contacts using a commercial rapid test containing ND-O/LID-1 antigens. *Lepr Ver* [Internet]. 2017 [citado em 10 jan 2020]; 88: 174–183. Disponível em: <https://repositorio.unifesp.br/bitstream/handle/11600/53682/WOS000411656500003.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
25. Bühner-Sékula S. Sorologia PGL-I na hanseníase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [Internet]. 2008 [citado em 04 nov 2019]; 41(2):3-5. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/X7vghsYT9pN8FQGPRQnHq9R/?lang=pt>. DOI: 10.1590/S0037-86822008000700002.
26. Bovolini GM, Silva EA, Souza VNB. Desempenho de antígenos do *Mycobacterium lepra* para diagnóstico sorológico da Hanseníase e avaliação de contatos intradomiciliares: revisão de literatura. *Hansen Int* [Internet]. 2018 [citado em 10 jan 2021]. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ses-36482>.
27. Hungria EM et al. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* [Internet]. 2012 [citado em 08 jan 2020]; 107(1):104-111. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000900017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/vrcFj7qSxv68RpRzjs6qv8f/?lang=en> DOI: 10.1590/S0074-02762012000900017.
28. Katoch VM. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy. *Expert Rev. Mol. Med*. 2002; 4(15): 1-14. DOI: 10.1017/S1462399402004763.
29. Nardi SMT, Cruz LP, Pedro HSP, Marciano LHSC, Pachol VDA. Avaliação das Deficiências Físicas em Pessoas com Hanseníase Empregando Dois Indicadores: Grau de Incapacidades e Eyes-Hands-Feet. *Hansen.Int* [Internet]. 2011 [citado em 08 jan 2020]; 36(2):9-15. Disponível em: http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1982-51612011000200002&lng=pt&tlng=pt.
30. Nardi, SMT; Paschoal, VDA; Chiaravalloti-Neto, F; Zanetta, DMT. Deficiências após a alta medicamentosa da hanseníase: prevalência e distribuição espacial. *Rev Saúde Pública* [Internet]. 2012 [citado em 08 jan 2020]; 46(6):969-77. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/wGFbSmjTLsKM6X8DybMZqFw/?format=pdf&lang=pt>.

31. Duppre NC. Risco de desenvolver hanseníase em contatos de pacientes, segundo positividade ao teste anti PGL-I e situação vacinal (BCG). Rio de Janeiro. Tese [Doutorado em Ciências da Saúde] - Fundação Oswaldo Cruz. Escola Nacional de Saúde Pública [Internet] 2008. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4565>.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de Hanseníase. Departamento de doenças de condições crônicas e infecções sexualmente transmissíveis – DCCI [Internet]. 2021 [citado em 05 jan 2021]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-epidemiologico-hanseniase-2021>.
33. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase [Internet]. 2010 [citado em 10 jan 2020]. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_procedimentos_tecnicos_corticosteroides_hanseniase.pdf.
34. Bhatia VN, Rao S, Saraswathi G. Auramine staining in histopathology sections. *Indian J. Lepr.* 1987; 59(4): 386-89.
35. Deepa A et al. Fluorescent Microscopy for Detection of Mycobacterium leprae. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* [Internet]. 2016 [citado em 10 jan 2020]; 10(10): 23-26. Disponível em: https://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?id=8739 DOI: 10.7860/JCDR/2016/22470.8739.
36. Prendes et al. La microscopia fluorescente em leprologia. Valoracion del método fluorescente frente al Ziehl-Neelsen em el diagnostico bacteriológico. *Int.J. Lepr.* 1953; 21(1): 35-40.
37. Martins MC. et al. Microscopia de fluorescência como procedimento para a realização do exame baciloscópico em hanseníase. *Hansen. Int.* [Internet]. 1991 [citado em 04 nov 2019]; 16(1): 29-34. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/299275840_Microscopia_de_fluorescencia_como_procedimento_para_a_realizacao_do_exame_baciloscopico_em_hanseniase.
38. Hardas V, Lele V. Evaluation of fluorescente microscopy for detection of M.Leprae. *Lepr. Indi.* 1981; 53(2): 273-77.
39. Lyon S. et al. Associação do teste sorológico ML Flow com a baciloscopia. *RevSocBrasMed Trop.* [Internet]. 2008 [citado em 17 dez 2019]; 41(2):23-6. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/NY9VVsX8Xfz9xtgC8spZKSz/?lang=pt> DOI: 10.1590/S0037-86822008000700006.
40. Contin LA et al. Uso do teste ML-Flow como auxiliar na classificação e tratamento da hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* [Internet] 2011 [citado em 17 out 2019]; 86(1): 91-95. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/NQz55Ht3SnvVvyqkm7Xxy5WN/?format=pdf&lang=pt>.

41. Bühner-Sékula S et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. *JClinMicrobiol*. [Internet]. 2003 [citado em 17 out 2019]; 41(5):1991-95. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.41.5.1991-1995.2003> DOI: 10.1128/JCM.41.5.1991-1995.2003.
42. CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão Técnica de Vigilância Epidemiológica da Hanseníase/CVE/CCD/SES. Casos Novos, Coeficiente de Detecção, Prevalência e Coeficiente de Prevalência de Hanseníase distribuída por GVE/Município de Residência. Estado de S.Paulo, 2017-2018. 2019. [Internet] Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/hanseniase/dados/hans_cn_ra_serie.pdf.
43. Bühner-Sékula S et al. The ML Flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification leprosy patients. *Leprosy Review*. [Internet]. 2007 [citado em 17 out 2019]; 78(1): 70-9. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/6314764_The_ML_Flow_test_as_a_point_of_care_test_for_leprosy_control_programmes_Potential_effects_on_classification_of_leprosy_patients.
44. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de prevenção de incapacidades: cadernos de prevenção e reabilitação em hanseníase. [Internet] 2008. [citado em 10 jan 2021]. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_prevencao_incapacidades.pdf.
45. Sarubi JC. Estudo comparativo das técnicas de Ziehl-neelsen e Auramina O na baciloscopia do raspado dérmico de quatro e seis sítios em casos novos de hanseníase, em serviço de Referência de Belo Horizonte. [Dissertação de mestrado] Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Medicina. [Internet] 2008. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/ECJS-7KWFLV>.
46. Limeira OM. Um estudo sobre a concordância entre os testes ML flow e baciloscopia no controle da hanseníase nos casos novos e reacionais pós alta multibacilares e seus contatos. [Dissertação de mestrado] Universidade de Brasília. [Internet] 2006. Disponível em: https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/5311/1/2006_Omesina%20Maroja%20Limeira.pdf.
47. Andrade ARC, Grossi MAF, Bühner-Sékula S, Antunes CMF. Soroprevalência do teste ML Flow em contatos de hanseníase de Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. [Internet]. 2008 [citado em 21 de nov 2020]; 41(2):56-59. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000700012&lng=en.
48. Freitas M.S. Utilização do ML Flow para auxílio diagnóstico e caracterização do tipo de Hanseníase no Rio Grande do Sul: um estudo de custo-efetividade. [Dissertação de mestrado] – Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS [Internet] 2012. Disponível em: http://repositorio.jesuita.org.br/bitstream/handle/UNISINOS/3203/Uitlizacao_ML.pdf?sequence=1&isAllowed=y.

49. Femina LL, Nardi SMT, Donda P, Lozano AW, Pedro HSP, Paschoal VDA. Contatos domiciliares: informações encontradas nos prontuários e nas entrevistas com caso índice de hanseníase. *Rev. Bras. Pesq. Saúde*, Vitória, 2019 jul-set; 21(3): 85-92.
50. Niitsuma ENA et al. Fatores associados ao adoecimento por hanseníase em contatos: revisão sistemática e metanálise. *Rev. Bras. Epidemiologia*. [Internet]. 2021 [citado em 05 de jan 2021]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbepid/a/6yRXLPsd7gnJ7RTFqJ5mqTb/?lang=pt&format=pdf>.
51. Santos KCB, Corrêa RGCF, Rolim ILTP, Pascoal LM, Ferreira AGN. Estratégias de controle e vigilância de contatos de hanseníase: revisão integrativa. *Saúde debate* [Internet]. 2019 [citado em 10 jan 2020]; 43(121):576-591. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sdeb/a/vCns7tfySyNG5MkC4kbJxnb/?format=pdf&lang=pt>.
52. Durães SMB, Guedes LS, Cunha MD, Magnanini MMF, Oliveira MLWDR. Estudo epidemiológico de 107 focos familiares de hanseníase no município de Duque de Caxias - Rio de Janeiro, Brasil. *An Bras Dermatol*. [Internet]. 2010 [citado em 21 de nov 2020]; 85(3):339-45. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/HhRw99xGqG95VN9w87PbmmQ/?format=pdf&lang=pt>.
53. Grossi MAF et al. A influência do teste sorológico ML Flow na classificação da hanseníase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. [Internet]. 2008 [citado em 21 de nov 2020]; 41(2). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/ytjPsB6mrypjnYhQxyK6qHK/?lang=pt>.
54. Frade MAC, de Paula NA, Gomes CM, Vernal S, Bernardes Filho F, Lugão HB, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet] 2017 [citado em 21 de nov de 2020]; 11(2). Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005375>.
55. Gallo MEN, Ramos Jr LAN, Albuquerque ECA, Nery JAC, Sales AM. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [Internet]. 2003 [acesso em 10 de jan 2021]. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/Bm8cQkZ4N6RPRzKvFSdzYhz/?format=pdf&lang=pt>.
56. Brito MFM et al. Associação entre reação hansênica após alta e a carga bacilar avaliada utilizando sorologia anti PGL-I e baciloscopia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* [Internet]. 2008 [citado em 10 jan 2021]; 41(2):67-72. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/KstcJGMZBjSQGy8Sxz7kW4t/?lang=pt>.

57. Lopes LQ et al. Soropositividade ao PGL-I em um centro de reintegração para pessoas atingidas pela hanseníase e diferentes Regiões do Município de Anápolis-Goiás / Seropositivity to PGL-I in a reintegration center for people affected by leprosy and different regions in the Municipality of Anápolis-Goiás. *Brazilian Journal of Health Review*, Curitiba. [Internet] 2021 [citado em 05 jan 2021]; 4(2): 6834-6845. Disponível em: <https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/view/27335>.
58. Nardi SMT et al. O Papel da Capacitação em Saúde nos Resultados da Baciloscopia para Hanseníase. *Rev. Bras. Ciências da Saúde*. [Internet]. 2020 [citado em 10 jan 2021]; 24(4): 505-516. Disponível em: <https://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/rbcs/article/view/5213>.

APÊNDICE A



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
CLR - IAL SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – X
Rua Alberto Sufredine, 2325 – Maceno – São José do Rio Preto
Fone Fax: (17)3224-2602



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da Hanseníase

A equipe de profissionais e pesquisadores coordenada por Naiara Cristina Ule Belotti de Souza está realizando a pesquisa acima citada. Gostaríamos de lhe convidar a participar desta pesquisa e para isso precisamos de sua autorização.

Este estudo tem o objetivo de comparar dois exames para contribuir na classificação clínica da hanseníase em pessoas que comparecem para consulta em cada uma das unidades de saúde dos 48 municípios os quais o IAL é referência laboratorial para hanseníase. As pessoas submetidas à consulta médica (história clínica e exame da pele e nervos, aproximadamente 10 minutos) que tiverem o exame baciloscopia solicitado pelo médico (raspado intradérmico do lóbulo de orelha, cotovelo ou lesão) e que aceitarem participar deste estudo responderão a um questionário para dados de identificação e endereço (5 minutos), além de serem, submetidas à coleta de 2 mL de sangue para dosagem de anticorpos (anti-PGL1), que serão realizadas por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificação da presença da bactéria (*M. leprae*) causadora da hanseníase. Todo o material biológico coletado será armazenado em Biorrepositório, seguindo as diretrizes Nacionais para Biorrepositórios e Biobancos de Material Biológico Humano, publicadas em Portaria Nº 2.201, de 14 de setembro de 2011. Todo material biológico ficará armazenado no Núcleo de Ciências Biomédicas do Centro de Laboratórios Regionais de São José do Rio Preto, SP.

A coleta de sangue ocorrerá após o consentimento do Sr(a), na unidade de saúde a qual o Sr (a) frequenta juntamente com a primeira consulta e após a coleta do raspado intradérmico pedido pelo médico. As coletas serão realizadas por profissionais treinados, com material limpo e descartável. A coleta de sangue pode provocar pequeno desconforto no momento da picada da agulha, e eventualmente hematoma no local após a coleta, não havendo nenhum outro risco envolvido. Os benefícios da pesquisa sugerida pela técnica proposta de microscopia de fluorescência por Auramina O é considerada mais sensível para o diagnóstico em pacientes com poucos bacilos e o teste ML Flow, por ser um teste rápido, poderá adiantar o diagnóstico e diminuir a cadeia de transmissão da hanseníase. Os profissionais responsáveis pela pesquisa disponibilizarão relatórios com os resultados dos exames para conhecimento da equipe médica e dos pacientes envolvidos na pesquisa. Conduta, atendimento médico e acompanhamento após os exames serão realizados de acordo com a necessidade do paciente e decisão da equipe médica da unidade.

A participação nesta pesquisa é voluntária, todos os procedimentos realizados não terão nenhum custo para o participante, e você participa somente se quiser. Caso haja uma nova pesquisa futura, será solicitado um novo termo de consentimento para o uso do material biológico.

Sempre que desejar serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo pelos contatos abaixo. A qualquer momento, você poderá recusar-se a continuar participando do estudo e, também, poderá retirar seu consentimento, sem que isso traga qualquer penalidade ou prejuízo a você. Além disso, caso se sinta vitimado por algum dano decorrente dessa pesquisa, poderá buscar ressarcimento de acordo com as leis vigentes no país. Após a assinatura da DECLARAÇÃO abaixo em duas vias de igual teor, ficando uma em sua posse, fica garantido o cumprimento do que foi informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo de sua identidade e das demais informações.

DECLARAÇÃO

Tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado AUTORIZO A MINHA PARTICIPAÇÃO NESTA PESQUISA, assim como A GUARDA DO MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO em biorrepositório, de forma VOLUNTÁRIA, SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Assinatura ou impressão dactiloscópica do participante

Nome legível do participante Maior de idade

LOCAL: _____ **DATA:** _____

Pesquisador responsável: _____

Contatos dos Pesquisadores Responsáveis:

Naiara Cristina Ule Belotti de Souza (17) 3224-2602 ramal 717 - e-mail: naiara.souza@ial.sp.gov.br
Heloisa da Silveira Paro Pedro – (17) 3224-2602 ramal 717 - e-mail: heloisa.pedro@ial.sp.gov.br

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - para dúvidas éticas:
Telefone (11) 3068-2859 / e-mail: cepial@ial.sp.gov.br

APÊNDICE B



**SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ – SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**



UNIDADE REQUISITANTE: _____

MUNICÍPIO REQUISITANTE: _____

SOLICITAÇÃO DE BACILOSCOPIA DE RASPADO INTRADÉRMICO

NOME COMPLETO: _____

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___ SEXO: ___ PRONTUÁRIO: _____

ENDEREÇO: _____ Nº _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ UF: _____

DATA DA COLETA: ___/___/___

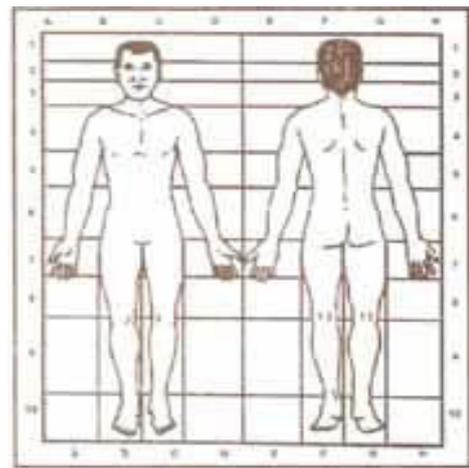
DIAGNÓSTICO

CONTROLE DE TRATAMENTO

LOCALIZAÇÃO DA COLETA:

ASSINALE A LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES:

- LOD
- LOE
- CD
- CE
- LESÃO



OBS.: _____

APÊNDICE C



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
 CLR - IAL SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – X
 Rua Alberto Sufredine, 2325 – Maceno – São José do Rio Preto
 Fone Fax: (17)3224-2602



FORMULÁRIO DO PACIENTE

Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML-Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da Hanseníase

Responsável pelo preenchimento: _____

Nome da unidade e município: _____

1. Nome do paciente: _____

2. Endereço: _____ Bairro: _____

3. Município: _____

4. Telefone: _____

5. E-mail: _____

6. Data de nascimento: ____/____/____

7. Idade: _____

8. Sexo: () Masculino () Feminino

9. Cor: () Branco () Pardo () Negro () Amarelo

10. Quanto tempo estudou?

() 0 – 4 anos () 5 – 8 anos () 9 – 11 anos () mais de 11 anos

11. Qual é sua ocupação? _____

12. Atualmente está:

() empregado () desempregado () aposentado

13. Qual sua renda pessoal?

() Até 1 salário mínimo () 2 a 4 salários () 5 a 10 salários () mais de 10 salários.

14. Qual sua renda familiar?

() Até 1 salário mínimo () 2 a 4 salários () 5 a 10 salários () mais de 10 salários

15. Possui alguma comorbidade:

() diabetes () hipertensão () outra Quais? _____

16. Faz uso de medicamentos?

() Não () Sim Quais? _____

17. Tem ou teve contato direto com pessoas portadoras da hanseníase?

- na família no trabalho na escola na igreja, clube ou outros locais
 não tive contato

18. Em caso familiar, qual o grau de parentesco:

- esposa/esposo irmãos filhos pais tios, avós outros

19. Na sua família teve mais de um caso de hanseníase?

- Não Sim. Se sim, quem? _____

20. Sua doença começou de que forma?

- manchas dormência perda de força feridas nas mãos e pés
 dores nos nervos outros. Especificar: _____

21. Está em tratamento para hanseníase?

- Não Sim

22. . Está de alta?

- Não Sim. Se sim, há quanto tempo? _____

23. Tem deficiências nas mãos, pés e olhos?

- Não Sim Especifique: _____

26. Tem marcas de vacina BCG (braço direito no deltoide)?

- Não Sim

Se sim, quantas marcas? Uma Duas mais que duas

APÊNDICE D



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
 COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
 CLR - IAL SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – X
 Rua Alberto Sufredine, 2325 – Maceno – São José do Rio Preto
 Fone Fax: (17)3224-2602



FORMULÁRIO UNIDADE DE SAÚDE

Nome da Unidade: _____

Município: _____

Nome do paciente: _____

Data de nascimento: ____/____/____ N° Prontuário: _____

Responsável pelo preenchimento: _____

E-mail do responsável pelo preenchimento: _____

1. Situação do caso:

- Caso novo Transferência outro município Transferência de outro estado
 Transferência outro país Controle de tratamento Recidiva

2. Número de lesões cutâneas: _____

3. Número de nervos acometidos: _____

4. Qual sintoma clínico atual do paciente?

- áreas ou manchas anestésicas lesão neural nódulos/hansenoma
 estado reacional

5. Grau de Incapacidade: 0 I II

6. Forma Clínica: I T D V

7. Classificação Operacional (OMS)

PB MB

8. Esquema terapêutico inicial:

PQT/PB/6 doses PQT/MB/12 doses

9. Efeitos adversos: _____

10. Mudança de esquema terapêutico:

Não Sim Qual? _____

11. Realizou exame histopatológico: Não Sim

Resultado: _____

(PREENCHIMENTO PELO LABORATÓRIO)

12. Exames Laboratoriais:

Baciloscopia - BAAR (IB)

Auramina O = negativa positiva

Ziehl-Neelsen = negativa positiva

Número de sítios de coleta: 1 2 3 4 5 6

13. Resultado do IB por sítio:

Lóbulo Direito: 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+

Lóbulo Esquerdo: 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+

Cotovelo Direito: 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+

Cotovelo Esquerdo: 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+

Lesão 1: 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+

Lesão 2: 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+

Outros: 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+

Especificar: _____

14. Resultado do teste ML Flow:

negativo positivo

APÊNICE E

AVALIAÇÃO SIMPLIFICADA DAS FUNÇÕES NEURAIS E COMPLICAÇÕES

Unidade _____ Município _____ UF _____ Prontuário _____
 Nome _____ Data nasc. ____/____/____
 Classificação Operacional _____ Ocupação _____ Data diag: ____/____/____ Data alta: ____/____/____

FACE	1ª		2ª		3ª	
	D	E	D	E	D	E
Nariz						
Queixa principal						
Ressecamento (S/N)						
Ferida (S/N)						
Perfuração de septo (S/N)						
Olhos	D	E	D	E	D	E
Queixa principal						
Fecha olhos s/ força (mm)						
Fecha olhos c/ força (mm)						
Triquiase(S/N)/ Ectrópio(S/N)						
Dimin. sensib. córnea (S/N)						
Opacidade córnea (S/N)						
Catarata (S/N)						
Acuidade Visual						

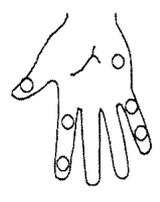
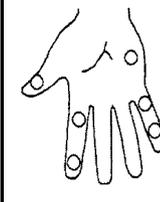
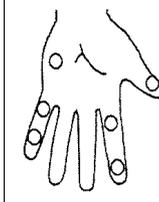
MEMBROS SUPERIORES	1ª		2ª		3ª	
	D	E	D	E	D	E
Queixa principal						
Palpação de nervos	D	E	D	E	D	E
Ulnar						
Mediano						
Radial						

Legenda: N = normal E = espessado D = dor

Avaliação da Força	1ª		2ª		3ª	
	D	E	D	E	D	E
Abrir dedo mínimo Abdução do 5º dedo (nervo ulnar) 						
Elevar o polegar Abdução do polegar (nervo mediano) 						
Elevar o punho Extensão de punho (nervo radial) 						

Legenda: F= Forte D=Diminuída P=Paralisado ou 5= Forte, 4=Resistência Parcial, 3=Movimento completo, 2=Movimento Parcial, 1=Contração, 0=Paralisado

Inspeção e Avaliação Sensitiva

1ª		2ª		3ª	
D	E	D	E	D	E
					

Legenda: Caneta/filamento lilás(2g): Sente ✓ Não sente X ou Monofilamentos: seguir cores

Garra móvel: M Garra rígida: R Reabsorção: // Ferida: ◻

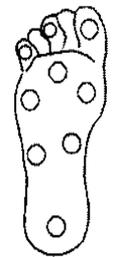
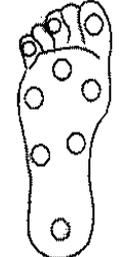
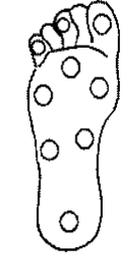
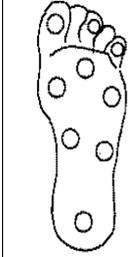
MEMBROS INFERIORES	1ª		2ª		3ª	
Queixa principal						
Palpação de nervos	D	E	D	E	D	E
Fibular						
Tibial posterior						

Legenda: N = normal E = espessado D = dor

Avaliação da Força	1ª		2ª		3ª	
	D	E	D	E	D	E
Elevar o hálux Extensão de hálux (nervo fibular) 						
Elevar o pé Dorsiflexão de pé (nervo fibular) 						

Legenda: F=Forte D=Diminuída P=Paralisado ou 5=Forte, 4=Resistência Parcial, 3=Movimento completo, 2=Movimento Parcial, 1=Contração, 0=Paralisado

Inspeção e Avaliação Sensitiva

1ª		2ª		3ª	
D	E	D	E	D	E
					

Legenda: Caneta/filamento lilás(2g): Sente ✓ Não sente X ou Monofilamentos: seguir cores
Garra móvel: M Garra rígida: R Reabsorção: 

CLASSIFICAÇÃO DO GRAU DE INCAPACIDADE (OMS)

DATA DA AVALIAÇÃO	OLHOS		MÃOS		PÉS		MAIOR GRAU	EHF	ASSINATURA
	D	E	D	E	D	E			
Aval. diagnóstico / /									
Aval. de alta / /									

LEGENDA PARA PREENCHIMENTO DO GRAU DE INCAPACIDADES

GRAU	CARACTERÍSTICAS
0	Olhos: Força muscular das pálpebras e sensibilidade da córnea preservadas e conta dedos a 6 metros ou acuidade visual $\geq 0,1$ ou 6:60. Mãos: Força muscular das mãos preservada e sensibilidade palmar: sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica. Pés: Força muscular dos pés preservada e sensibilidade plantar: sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.
1	Olhos: Diminuição da força muscular das pálpebras sem deficiências visíveis e/ou diminuição ou perda da sensibilidade da córnea: resposta demorada ou ausente ao toque do fio dental ou diminuição/ausência do piscar. Mãos: Diminuição da força muscular das mãos sem deficiências visíveis e/ou alteração da sensibilidade palmar: não sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica. Pés: Diminuição da força muscular dos pés sem deficiências visíveis e/ou alteração da sensibilidade plantar: não sente o monofilamento 2 g (lilás) ou o toque da ponta de caneta esferográfica.
2	Olhos: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase, como: lagoftalmia; ectrópio; entrópio; triquiase; opacidade corneana central; iridociclite e/ou não conta dedos a 6 metros ou acuidade visual $< 0,1$ ou 6:60, excluídas outras causas. Mãos: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase, como: garras, reabsorção óssea, atrofia muscular, mão caída, contratura, feridas. Pés: Deficiência(s) visível(eis) causadas pela hanseníase, como: garras, reabsorção óssea, atrofia muscular, pé caído, contratura, feridas.

ANEXO A

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da hanseníase

Pesquisador: NAIARA CRISTINA ULE BELOTTI DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 33756720.2.0000.0059

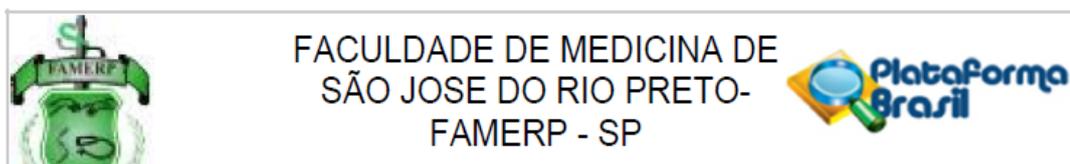
Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.245.079

ANEXO B

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo entre diferentes técnicas de coloração em baciloscopia e teste rápido ML Flow para o diagnóstico, classificação clínica e controle da hanseníase

Pesquisador: NAIARA CRISTINA ULE BELOTTI DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 33756720.2.3001.5415

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de São Jose do Rio Preto- FAMERP - SP

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.280.586

MANUSCRITO

Laboratory diagnosis of Leprosy: two staining methods from bacilloscopy and rapid ML Flow test

ABSTRACT

Introduction: The diagnosis of leprosy is based on the characteristic signs and symptoms of the disease, subsidized by laboratory tests. When positive, the bacilloscopy closes the diagnosis for leprosy. Phenolic glycolipid-I, or PGL-I, is a molecule in the bacillus cell wall that confers a greater immune response. The ML Flow test is an immunochromatographic test for the detection of anti-PGL-I IgM in human blood or serum. **Methods:** Prospective study with data collection and biological materials in patients with suspected leprosy from August 2020 to May 2021. For microscopy, intradermal smears were stained with Auramine O, and after reading under a fluorescence microscope, reviewed by Ziehl-Neelsen. The ML Flow test was performed according to the Bühner-Sékula protocol. To assess the agreement between the methods, the Kappa index was estimated. **Results:** Of the 94 suspected leprosy patients, 31 (32,9%) were diagnosed with leprosy. There was moderate agreement between the results of the ML Flow and Auramine O tests (Kappa= 0,58), and substantial agreement between the ML Flow and Ziehl-Neelsen microscopy (Kappa= 0,72). In paucibacillary cases, serology was positive in 100% of patients. **Conclusions:** This study concluded that the Ziehl-Neelsen technique remains the best option for standard leprosy staining and the ML Flow test is more positive among the three techniques evaluated and can be an effective tool in the early diagnosis of Leprosy cases. **Keywords:** Leprosy; epidemiology; immunochromatography.

INTRODUCTION

Leprosy is still considered a public health problem, especially in countries whose prevalence rates exceed 1 case per 10.000 inhabitants.^[1] It manifests itself mainly in agglomerated populations with precarious sanitary conditions and access to health systems, therefore, it is included within the group of Neglected Tropical Diseases.^[2]

Diagnosis is based on the characteristic signs and symptoms of the disease, supported by laboratory tests. A case of leprosy is defined by the World Health Organization (WHO) by the presence of one or more of the following criteria: skin lesion with change in thermal or

painful sensitivity; peripheral nerve involvement with neural thickening and the presence of *Mycobacterium leprae* bacilli confirmed by smear microscopy or skin biopsy.^[3]

Bacillus is gram positive, with a cell wall with a high content of structural lipids, responsible for causing great hydrophobicity, hindering the action of aqueous dyes differentiators. Thus, it stains with fuchsin and does not bleach with acids and alcohols when stained by the Ziehl-Neelsen method, giving it the characteristic of an *acid-fast bacillus resistant* (AFB).^[3-4]

Bacilloscopy is an easy-to-perform and low-cost complementary test for detecting AFB directly from intradermal smears of lesions or from other selected collection sites, such as ear lobes, elbows and knees in suspected leprosy.^[4] The bacilloscopic exam, when positive, demonstrates the presence of the mycobacterium and indicates the most infective patients.^[5] Its specificity is high, however, it has low sensitivity.^[5-7] A negative bacilloscopy result does not rule out the diagnosis of leprosy, since bacilli are rarely detected in paucibacillary forms.^[5]

Phenolic glycolipid-I, or PGL-I, is the bacillus cell wall molecule that confers the greatest immune response. It was one of the first *Mycobacterium leprae* specific antigens to be isolated and characterized.^[8] The ML Flow serological test, developed in 2003 by Bühner-Sékula, is a simple, low cost and easy to perform lateral flow immunochromatographic test for the detection of IgM anti-PGL-I antibodies in human blood or sérum.^[8-9]

The aim of this study was to assess the agreement between the results of the ML Flow test and bacilloscopy performed by two staining techniques: Ziehl-Neelsen and Auramine O, observing the epidemiological and clinical profile of patients, the positivity and contribution of the tests in the diagnosis of leprosy.

METHODS

This is a prospective and exploratory study, with data collection and biological materials carried out in patients with suspected leprosy. The study included 94 patients suspected of having the disease, treated on a spontaneous demand in health units in ten cities in the region of São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil, belonging to the Epidemiological Surveillance Group (GVE-29), from August 2020 to May 2021.

After agreeing and signing the Informed Consent Form (FICF), all participants underwent clinical evaluation and collection of biological materials to undergo bacilloscopy and the ML Flow test. The exams were sent to be processed at the regional reference laboratory for leprosy bacilloscopy.

For bacilloscopy, an intradermal scraping slide containing four smears from each patient was collected. The smears were first stained with Auramine O, and after reading under a fluorescence microscope, the smears were stained by Ziehl-Neelsen. The reading was performed qualitatively (positive or negative) for the fluorescence microscopy technique. For the Ziehl-Neelsen technique, the Bacilloscopic Index counting was used in a common optical microscope.

The ML Flow test was performed according to the protocol described by Bühner-Sékula.^[8] To obtain the serum, a whole blood sample was collected to perform the serological test to verify the detection of anti-PGL-I IgM antibodies. The test is considered positive when the test area presents a red colored line and negative due to the absence of this line. The results were registered in a qualitative way.

After the exams were performed, the cases confirmed by the laboratory or by the clinic were submitted to an interview with a questionnaire and Simplified Neurological Assessment.

The collected data were organized in spreadsheets and for analysis the statistical program EPI INFO 7.1.2.0 Software (Atlanta, Georgia, USA) was used to obtain the distribution of frequency, mean and standard deviation of the variables of interest. For the association of two variables, a *p*-value <0,05 was considered and Fisher's or Chi-square tests were used as appropriate. To assess the agreement between the methods, the Kappa index was estimated, and for the interpretation of this index, the Landis & Koch criteria were used.

This study was approved in August 2020 by the Research Ethics Committee according to CAAE n° 33756720.2.0000.0059 and Opinion n° 4.245.079.

RESULTS

Of the 94 suspected leprosy patients treated by spontaneous demand, 31 (32.9%) were diagnosed with leprosy (22 new cases and 9 cases that had already undergone treatment for more than five years and were considered suspected of relapse). Among the diagnosed patients, there was a predominance of males (58.0%), older than 60 years (45.2%) of age and incomplete elementary education (45.1%). Regarding the history of comorbidities, hypertension and diabetes were prevalent. No participant was taking medication for leprosy.

Participants reported the onset of the clinical picture in 77.4% (n=24) as anesthetic spots, 61.2% (n=19) numbness and 22.5% (n=7) loss of strength. Direct contact with the most mentioned patients with the disease were, respectively: spouse (16.0%), children (13.0%) and siblings (13.0%). Four (12.9%) paucibacillary (PB) cases and 27 (87.0%) multibacillary (MB)

cases were diagnosed. Of the 22 newly diagnosed cases of leprosy, the most prevalent clinical form was borderline in 10 (45.4%) patients and of the 9 suspected cases of recurrence, the most present clinical form was lepromatous in 7 (77.7%) patients. There was no diagnosis of the indeterminate form in the patients evaluated.

Table 1 - Agreement between bacilloscopy and the ML Flow serological test of the 94 patients evaluated

		Ziehl-Neelsen		Auramine O		Total n (%)	*Value -p
		Positive n (%)	Negative n (%)	Positive n (%)	Negative n (%)		
ML FLOW	Positive	19 (90.5)	08 (11.0)	14 (93.3)	13 (16.5)	27 (28.7)	<0,05
	Negative	02 (9.5)	65 (89.0)	01 (6.7)	66 (83.5)	67 (71.3)	
TOTAL		21 (100)	73 (100)	15 (100)	79 (100)	94 (100)	
Kappa Index		0.72		0.58			
		IC a 95%= 0.56 – 0.88		IC a 95%= 0.39 – 0.76			

*Value -p= <0.05 (Fisher's test); IC= confidence interval

There was moderate agreement between the results of the ML Flow and Auramine O tests (Kappa= 0.58), and substantial agreement between the ML Flow and Ziehl-Neelsen (Kappa= 0.72), according to the Landis & Koch criteria. It was observed that 27 patients had positive serology, while 21 and 15 had positive Ziehl-Neelsen and Auramine O results, respectively. It was observed that 8 (11.0%) patients with negative Ziehl-Neelsen bacilloscopy had positive serology, while 2 (9.5%) patients had positive Ziehl-Neelsen bacilloscopy (Smear Index below 1.0) with negative serology. These two patients suspected cases of relapsed and who had already treated the disease for more than five years. The ML Flow test was more positive, considering that there were six more cases when compared to the bacilloscopy result.

Table 2 - Agreement of results between Ziehl-Neelsen and Auramine O bacilloscopy techniques of the 94 participants

		ZIEHL-NEELSEN				Total n %	
		Positive		Negative			
		n	%	n	%	n	%
AURAMINE O	Positive	15	71.5	0	0	15	16.0
	Negative	6	28.5	73	100	79	84.0
	Total	21	100	73	100	94	100

*Kappa Index = 0.79; Valor -p= <0.05 (Fisher's test)

Table 2 presents the results obtained between the Ziehl-Neelsen and Auramine O techniques evaluated. The agreement observed between the two staining techniques was substantial (Kappa= 0.79), considered good according to the Kappa Index.

Table 3 - Frequency distribution of clinical data when related to positive results of the three laboratory tests evaluated.

		ML Flow (+)		Ziehl-Neelsen (+)		Auramine O (+)		Value -p
		n°	%	n°	%	n°	%	
N° skin lesions	<5lesions (n=14)	14	100	9	64.2	7	50.0	> 0.05
	≥5lesions (n=15)	13	86.6	12	80.0	8	53.3	
N° damaged nerves	< 1 nerve (n=10)	10	100	6	60.0	5	50.0	> 0.05
	≥ 1 nerve (n=19)	17	89.4	15	78.9	10	52.6	
BCG vaccine scar	None (n=10)	10	100	4	40.0	2	20.0	> 0.05
	One (n=19)	17	89.4	17	89.4	13	68.4	
	Two (n=0)	0	0.0	0	0.0	0	0.0	
Classification Operational	PB (n=4)	4	100	0	0.0	0	0.0	-
	MB (n=25)	23	92.0	21	84.0	15	60.0	
Degree of physical disability	0 (n=8)	7	87.5	5	62.5	4	50.0	> 0.05
	1 (n=19)	18	94.7	15	78.9	10	52.6	
	2 (n=2)	2	100	1	50.0	1	50.0	

*Note: only the clinical variables of patients who tested positive in one or all laboratory tests were evaluated (n=29).

Of the 31 patients diagnosed with leprosy, two new cases were confirmed only by clinical evaluation, being negative in the three laboratory tests tested in this study, as shown in table 3.

DISCUSSION

Despite laboratory advances, even without an exam considered the gold standard in the diagnosis of leprosy, laboratory tests have been very useful in helping to classify patients, however, some exams are not available in most basic healthcare services. According to the Ministry of Health of Brazil,^[4] dermatological and neurological examination and positive bacilloscopy are still considered sovereign in defining the diagnosis of leprosy.

The epidemiological data found in our study are in line with the literature regarding the male gender,^[10-11] but differ in relation to the mean age, which was above the data reported by other authors who found involvement by leprosy in the more economically active adult stage.^[11-12] Low education and family income below two minimum wages are similar findings with data found in other studies^[13] and reflect the socioeconomic precariousness that favors the spread of the disease.

The contacts that were most cited are considered consanguineous households, who present a higher risk of illness due to leprosy.^[14] The clinical forms that most prevailed in the study were borderline and lepromatous, which attest to multibacillary forms of leprosy with greater ease in clinical and laboratory diagnosis, with higher numbers of reported cases,^[14-16] suggesting the hypothesis of failure in the initial diagnosis by the health services.

Since Brazil has a high burden of leprosy, the introduction of new laboratory techniques that contribute to the diagnosis of the disease, such as the ML Flow serological test, should be evaluated and compared to existing techniques for its routine application.^[17]

In this study, ML Flow test positivity occurred in 87.0% (n=27) of patients diagnosed with the disease, a finding consistent with studies carried out in Brazil that described seropositivity between 50.8% and 94.2%.^[9-10] The test showed strong agreement with the two bacilloscopies techniques evaluated, with a greater association with Ziehl-Neelsen, a result superior to those described in the literature.^[10,15] This finding shows that serological testing can be a great ally to help in the clinical classification of patients and to define the treatment.^[3]

Previously, the superiority of fluorescence microscopy over the Ziehl-Neelsen method was shown in histological sections of skin fragments^[18-19] or in intradermal scraping.^[20] In this study, positivity by the Ziehl-Neelsen technique was superior to the fluorescence technique, with results of 22.3% and 15.9%, respectively. According to previous researches, the introduction of the fluorescent method in the laboratory routine should initially occur as a screening of positive or negative smears, and later, after familiarization with the technique, the Bacilloscopic Index can be performed.^[20] There were no reports in the literature comparing staining using the Auramine O technique with serological tests, perhaps because serological tests such as ML Flow were developed at the research level and are not yet established as a routine laboratory.

Unlike other studies citing sensitivity of only 40% of the ML Flow test in paucibacillary cases,^[8-9] our results detected positive serology in 100% of patients classified as PB. Despite the limited n that may have been an obstacle to this research, it is noteworthy that the ML Flow test is not recommended as the only diagnostic test, as most PB cases may not develop detectable antibodies in serology.^[8,21] These four (4) PB patients also had up to five skin lesions with anesthetic areas and reported having direct contact with patients with the disease in the questionnaires.

Most patients diagnosed with leprosy had one or more compromised nerves, and this finding is strongly related to the positive results of the ML Flow test (89.4%) and of bacilloscopy using the Ziehl-Neelsen technique (78.9%). Although the region studied is

considered a non-endemic region, our findings showed that the diagnosed cases present some physical disability already installed (Degree of Physical Disability 1 and 2), which suggests a late diagnosis of the disease.

As for the number of skin lesions, half (51.7%) of the patients had five or more lesions, mainly associated with the positive result of the ML Flow test (86.6%) followed by the positive result of the Ziehl-Neelsen bacilloscopy (80.0%). Of the 11 patients who reported absence of a Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine scar, 100% had positive serology. There are reports that in unvaccinated individuals there is a tendency towards an increase in antibody titers to PGL-I, reaffirming vaccination as an important measure of disease control.^[22,23]

The multivariate analysis of the variables of interest in Table 3 did not show statistical significance, however, as this was a small number of patients diagnosed in a region considered non-endemic, this was a limiting factor for this research.

Thus, as there is no gold standard test for the disease, our results show how important it is to complement the standard diagnosis with serology to add or direct to a more reliable laboratory result in the classification of cases and in the appropriate choice of treatment for the patient.

CONCLUSION

There was greater agreement between the results of the ML Flow serological test and the bacilloscopy by Ziehl-Neelsen, when compared to the results of the bacilloscopy by Auramine O. Among the proposed microscopy techniques, it is concluded that the Ziehl-Neelsen technique remains the best option for standard leprosy staining. Related to the positive results of the ML Flow test and bacilloscopy using the Ziehl-Neelsen technique, most patients diagnosed with leprosy in our study had one or more compromised nerves, Degree of Physical Disability 1, five or more skin lesions and no scar BCG vaccine.

The ML Flow test showed the highest positivity among the three techniques evaluated. As it is a quick and easy-to-perform test, it can be a useful and effective auxiliary tool in the early diagnosis of leprosy cases, to be used routinely at any level of the health service, as there is no gold standard laboratory test for leprosy.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES

1. WHO. World Health Organization. Global Leprosy Strategy 2016-2020: Accelerating towards a leprosy-free world. 2016. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208824/9789290225096_en.pdf?sequence=14&isAllowed=y
2. WHO. World Health Organization. Towards Zero Leprosy. Global Leprosy (Hansen's Disease) Strategy 2021–2030. World Health Organization. 2021. ISBN: 978-92-9022-850-9. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/340774>
3. Brazil. Ministry of Health. Guidelines for Surveillance, Care and Elimination of Leprosy as a Public Health Problem: Technical-Operational Manual. Brasilia: Ministry of Health; 2016.p.58.
4. Brazil. Ministry of Health. Department of Health Policy. Guide for the control of leprosy. Primary Care Notebooks. Brasilia: Ministry of Health; 2002.p.89.
5. Britton WJ, Lockwood NL. Leprosy. *The Lancet*. 2004; 363:1209-19. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)15952-7.
6. Somoskövi A et al. Lessons from a proficiency-testing event for acid-fast microscopy. *Chest*. 2001; 120: 250-57.
7. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *J.Am.Acad. Dermatol*. 2004; 51(3): 417-26.
8. Bühner-Sékula S et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. *JClinMicrobiol*. 2003; 41(5):1991-95.
9. Contin LA et al. Use of the ML-Flow test as a tool in classifying and treating leprosy. *Brazilian Annals of Dermatology*. 2011; 86(1): 91-95.
10. Lyon S et al. Association of the ML Flow serological test with bacilloscopy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2008; 41(2):23-6.
11. Sarubi JC. Comparative study of Ziehl-neelsen and Auramine O techniques in smear microscopy of four- and six-site dermal scrapings in new cases of leprosy, in a reference service in Belo Horizonte. [Master's dissertation] Federal University of Minas Gerais - Faculty of Medicine. 2008. <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/ECJS-7KWFLV>
12. Limeira OM. A study on the agreement between the ML flow and bacilloscopy tests in the control of leprosy in new and reactive multibacillary cases and their contacts. [Master's dissertation] University of Brasília. 2006.

https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/5311/1/2006_Omesina%20Maroja%20Limira.pdf

13. Andrade ARC, Grossi MAF, Bühner-Sékula S, Antunes CMF. Seroprevalence of the ML Flow test in leprosy contacts in Minas Gerais. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(2):56-59.
14. Santos KCB, Corrêa RGCF, Rolim ILTP, Pascoal LM, Ferreira AGN. Strategies for control and surveillance of leprosy contacts: integrative review. *Health debate.* 2019; 43(121):576-591.
15. Grossi MAF et al. The influence of the ML Flow serological test on the classification of leprosy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(2).
16. Frade MAC, de Paula NA, Gomes CM, Vernal S, Bernardes Filho F, Lugão HB, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(2).
17. Brazil. Ministry of Health. Health Surveillance Secretariat. Epidemiological Bulletin of Leprosy. Department of Chronic Diseases and Sexually Transmitted Infections. Brasilia: Ministry of Health; 2021.p.56
18. Bhatia VN, Rao S, Saraswathi G. Auramine staining in histopathology sections. *Indian J. Lepr.* 1987; 59(4): 386-89.
19. Deepa A et al. Fluorescent Microscopy for Detection of Mycobacterium leprae. *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* 2016; 10(10): 23-26.
20. Prendes et al. La microscopia fluorescente em leprologia. Valoracion del método fluorescente frente al Ziehl-Neelsen em el diagnóstico bacteriológico. *Int.J. Lepr.* 1953; 21(1): 35-40.
21. Bühner-Sékula S et al. PGL-I serology in leprosy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2008; 41(2):3-5.
22. Niitsuma ENA et al. Factors associated with the development of leprosy in contacts: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Bras. Epidemiology.* 2021; 24: E210039.
23. Lopes LQ et al. Seropositivity to PGL-I in a reintegration center for people affected by leprosy and different regions in the Municipality of Anápolis-Goiás. *Brazilian Journal of Health Review, Curitiba.* 2021; 4(2): 6834-6845.