

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

Juliana Cunha Sarubi

**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**

**Belo Horizonte
2008**

Juliana Cunha Sarubi

**ESTUDO COMPARATIVO DAS TÉCNICAS DE ZIEHL-NEESEN 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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Serufo

**Belo Horizonte
2008**

S243e Sarubi, Juliana Cunha.
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 [manuscrito]. / Juliana Cunha Sarubi. -- Belo Horizonte: 2008.
131f:
Orientador: José Carlos Serufo.
Área de concentração: Infectologia e Medicina Tropical.
Linha de pesquisa: Métodos de diagnóstico laboratorial.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Hanseníase/diagnóstico. 2. Hanseníase/classificação. 3. Microscopia de fluorescência. 4. Mycobacterium leprae. 5. Coloração. 6. Dissertações acadêmicas. I. Serufo, José Carlos. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM : WC 335

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Professor Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA

Professora Heloisa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Jaime Arturo Ramirez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Professor Carlos Alberto Pereira Tavares

DIRETOR DA FACULDADE DE MEDICINA

Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR

Professor Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor Carlos Faria Santos Amaral

SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Professor João Lúcio dos Santos Júnior

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha (Coordenador).

Prof. Antônio Lúcio Teixeira Júnior (Sub-coordenador)

Prof. Jose Roberto Lambertucci

Prof. Carlos Mauricio Figueiredo Antunes

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Fátima Lúcia Guedes Silva (representante discente)

A Deus, razão do nosso viver.

Ao Maurício, grande amor e companheiro, sempre presente em todos os momentos dessa trajetória.

Aos meus pais, Eduardo e Heloisa, meus irmãos, Flávia, Rodrigo e Helena, e sobrinhas, Bruna e Maria Vitória, fontes inesgotáveis de estímulo.

À madrinha Celma, ao Dr. Maurício, à Vitória e à amiga Teresa, exemplos de coragem e determinação.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Carlos Serufo, pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação, por sua amizade, sabedoria, apoio e disponibilidade em todos os momentos, confiança e constante incentivo.

Ao Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha, grande exemplo, pela confiança, oportunidade e incentivo à busca contínua pelo conhecimento.

À Dra Sandra Lyon, coordenadora da residência médica em Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG, a quem eu devo minha formação, pela amizade, pelo estímulo à vocação acadêmica, pelo carinho e incansável auxílio em todos os momentos.

À Dra. Maria Aparecida de Faria Grossi, pelo apoio, carinho, incentivo e convívio enriquecedor.

Ao Dr Agnaldo Lopes da Silva Filho, pela amizade e auxílio na análise dos resultados.

Ao Hyllo, Reinaldo e Jane, pela colaboração na leitura e interpretação dos exames baciloscópicos.

À Raquel e Carolina, pela contribuição na coleta dos exames e organização do banco de dados.

Ao Plínio Rafael Reis Monteiro, pelo apoio técnico na análise estatística dos dados.

À Maria do Rosário, pela disponibilidade e auxílio na pesquisa bibliográfica.

A todos os amigos, professores, médicos e funcionários do Hospital Eduardo de Menezes que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

MORFÉTICO

*A braços com eternos sonos.
Traços esvaem-se, e sonhos...*

*Estrema-se em suas dores,
a da doença anestesiando o corpo,
a da exclusão de amores,
e do olhar dos outros,
perversor de valores.*

*Quatro ou seis sítios,
coloridos ou fluorescentes,
concordantes baciloscópicos.
Operacional simplista.
Belos sítios, sítios de Madrid.*

*Prevalência menor que a incidência,
entre as primeiras do mundo.
Orgulho de ser brasileiro.
Cultura inútil, lesão alguma.
Índice zero, solução nenhuma...
O sistema repousa nos braços de Morfeu...*

*De um amor bruto,
de um comido de lazeira...*

Jocase, 2008

RESUMO

RESUMO

A hanseníase constitui importante problema de saúde pública mundial. Ao longo das últimas décadas, as taxas de prevalência têm declinado, entretanto as taxas de detecção mantêm-se elevadas. A baciloscopia é o exame complementar de maior utilidade no diagnóstico, sendo realizada através do método de Ziehl-Neelsen. Entretanto, existem dificuldades, como a detecção de bacilos nos casos paucibacilares e o tempo considerável de leitura, que podem resultar em fadiga e erro. A microscopia de fluorescência tem se mostrado promissora na detecção de bacilos álcool-ácido resistentes, em especial, nos casos com escassez de bacilos. O Ministério da Saúde do Brasil (MS) preconiza a coleta do material em quatro sítios; entretanto, alguns centros de referência realizam o procedimento em seis sítios. Utilizando dois examinadores independentes na baciloscopia do raspado dérmico de casos novos de hanseníase, realizou-se estudo descritivo e exploratório comparando os testes de Ziehl-Neelsen e Auramina O, entre quatro e seis sítios, em correlação com as variáveis sexo, idade, número de lesões cutâneas, número de nervos envolvidos, classificação de Madrid e classificação operacional adotada pelo MS. Incluíram-se 110 pacientes, diagnosticados no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, ou referenciados ao mesmo, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007. Para a baciloscopia, utilizou-se coleta de esfregaço dérmico em seis sítios (lesão cutânea, cotovelo contralateral, lóbulos auriculares e joelhos), com duas amostras de cada sítio para coloração pelas técnicas em estudo, sendo o resultado expresso de forma quantitativa e qualitativa. As análises de concordância utilizaram o índice de Kappa e o Coeficiente de Correlação Intraclasse. A análise de associação entre as variáveis empregou a regressão logística. A concordância foi excelente na análise interobservador, entre as técnicas e entre o número de sítios analisados, segundo os critérios de Landis & Koch. Embora os métodos não se diferenciem se considerada a aplicabilidade clínica, a microscopia de fluorescência detectou, em média, mais bacilos. A baciloscopia apresentou tendência a maior positividade quando maior número de sítios foi analisado, porém, sem significância estatística ($p=0,50$). A concordância entre exame baciloscópico e classificação operacional foi moderada e evidenciou-se associação significativa entre esse exame e a classificação de Madrid. A positividade da baciloscopia (35%) foi estatisticamente associada aos pacientes com mais de cinco lesões cutâneas ($\text{Exp(B)}: 19,29$) e com mais de um nervo comprometido ($\text{Exp(B)}: 3,51$). A técnica fluorescente, assim como a análise de maior área de esfregaço, seja por aumento do número de sítios ou de campos examinados, podem constituir opções para aumentar a sensibilidade da baciloscopia em casos paucibacilares com resultado negativo pelo método tradicional. Os resultados deste estudo suportam a baciloscopia pela técnica de Ziehl-Neelsen em quatro sítios como método auxiliar padrão para o diagnóstico e classificação da hanseníase.

Palavras-chave: hanseníase, *Mycobacterium leprae*, baciloscopia, coloração, Ziehl-Neelsen, microscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Leprosy is regarded as an important public health problem worldwide. Over recent decades, the prevalence rate has declined, however the detection rate remains high. Skin smear is the best supplementary proceeding for the diagnosis and is performed by Ziehl-Neelsen's staining method. However, there are difficulties such as the detection of bacilli in paucibacillary cases and the considerable time of reading, which can lead to fatigue and error. Fluorescence microscopy has shown promise in the detection of alcohol-acid resistant bacilli, especially in cases of scarce bacilli. Brazilian Health Department requires collection of samples on four sites; however, some reference centers perform the procedure on six sites. Using two independent examiners on skin smear, in new cases of leprosy, descriptive and exploratory study was carried out comparing Ziehl-Neelsen and Auramine staining, among four and six sites, correlating the variables sex, age, number of skin lesions, number of nerves involved, Madrid classification and the operational classification adopted by Health Department. The study group consisted of 110 subjects, who were admitted at a Reference Service in Sanitary Dermatology in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, from September 2006 to October 2007. Skin smears were obtained from six sites (skin lesion, contrary elbow, ear lobes and knees), with two samples from each one to be stained by the techniques, and expressed as quantitative and qualitative results. Agreement analyses used Kappa index and Intraclass Correlation Coefficient. The association of skin smears with the variables was analyzed through logistic regression. The strength of the agreement was considered to be very good in the analysis interobserver, between the techniques and the number of sites examined, according to Landis & Koch's criteria. Although the staining methods do not differentiate when considering its clinical applicability, fluorescence microscopy detected more bacilli on bacterial index. Skin smears tended to be more positive when a greater number of sites was analyzed, but without statistical significance ($p=0.50$). The agreement between skin smear and operational classification was considered to be moderate and there was significant association between this procedure and Madrid classification. Positive smears observed (35%) were statistically correlated with patients who had more than five skin lesions (Exp (B): 19,29) and more than one nerve involved (Exp(B): 3,51). Fluorescence microscopy, as well as the analysis of a greater area, either by increasing the number of sites or surface examined, can provide options to increase the sensitivity of smear in paucibacillary cases with negative results on four sites. The result of this study supports Ziehl-Neelsen on four sites as an auxiliary standard method for the diagnosis and classification of leprosy.

Key-words: leprosy, *Mycobacterium leprae*, skin smear, staining, Ziehl-Neelsen, fluorescence microscopy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- Esquema representativo da coleta de esfregaços para realização da baciloscopia por paciente.....	45
FIGURA 2	- Gráfico com a correlação entre Ziehl-Neelsen e Auramina O em quatro sítios.....	63
FIGURA 3	- Gráfico com a correlação entre Ziehl-Neelsen e Auramina O em seis sítios.....	63
FIGURA 4	- Gráfico com a curva ROC da idade para baciloscopia positiva pela técnica de Ziehl-Neelsen em quatro sítios.....	70

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	- Situação global da hanseníase no início de 2007, por região da OMS (excluindo a Europa).....	22
TABELA 2	- Taxas de prevalência e detecção dos países que ainda não alcançaram a meta de eliminação da hanseníase.....	23
TABELA 3	- Prevalência e detecção da hanseníase, segundo Unidade Federada – Brasil, 2006.....	24
TABELA 4	- Correlação entre as classificações de Madrid, Ridley & Jopling e OMS adotadas para a hanseníase.....	29
TABELA 5	- Grau de Concordância de acordo com o Coeficiente Kappa.....	51
TABELA 6	- Coeficiente de Correlação Intraclasse.....	52
TABELA 7	- Distribuição dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes no período de setembro de 2006 a outubro de 2007.....	58
TABELA 8	- Concordância interobservador da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen em quatro sítios.....	59
TABELA 9	- Concordância interobservador da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen em seis sítios.....	59
TABELA 10	- Concordância interobservador da baciloscopia pelo método da Auramina em quatro sítios.....	60
TABELA 11	- Concordância interobservador da baciloscopia pelo método da Auramina em seis sítios.....	60
TABELA 12	- Confiabilidade interobservador dos métodos de coloração.....	61
TABELA 13	- Comparação dos resultados entre os observadores através de testes <i>t</i>	61
TABELA 14	- Casos discordantes entre os dois examinadores.....	62
TABELA 15	- Concordância da baciloscopia entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro sítios.....	64
TABELA 16	- Concordância da baciloscopia entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina em seis sítios.....	64
TABELA 17	- Concordância da baciloscopia entre quatro e seis sítios pelo método de Ziehl-Neelsen.....	65
TABELA 18	- Concordância da baciloscopia entre quatro e seis sítios pelo método da Auramina.....	65
TABELA 19	- Confiabilidade entre os métodos de coloração e entre o número de sítios.....	66
TABELA 20	- Comparação dos resultados entre os métodos de coloração e entre o número de sítios através de testes <i>t</i>	66
TABELA 21	- Concordância entre a baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro e seis sítios e a classificação operacional.....	67
TABELA 22	- Medidas de concordância entre os métodos de coloração e a classificação operacional.....	67

TABELA 23	- Associação entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e a Classificação de Madrid.....	68
TABELA 24	- Associação entre o resultado do teste de Ziehl-Neelsen e as covariáveis do estudo na análise bivariada.....	69
TABELA 25	- Associação entre a positividade do teste de Ziehl-Neelsen e as covariáveis do estudo na análise multivariada.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAAR	- Bacilo álcool-ácido resistente
Classificação Operacional	- Classificação operacional recomendada pela OMS e adotada pelo MS em 2002
D	- Dimorfo
DD	- Dimorfo-dimorfo
DT	- Dimorfo-tuberculóide
DV	- Dimorfo-virchowiano
FHEMIG	- Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
HEM	- Hospital Eduardo de Menezes
I	- Indeterminado
ICC	- <i>Intraclass Correlation Coefficient</i>
IB	- Índice bacilosκόpio
<i>M. leprae</i>	- <i>Mycobacterium leprae</i>
MB	- Multibacilares
ML Flow	- Teste de fluxo lateral para o <i>Mycobacterium leprae</i>
MS	- Ministério da Saúde do Brasil
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PB	- Paucibacilares
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PGL-I	- <i>Phenolic glycolipid-I</i>
T	- Tuberculóide
TT	- Tuberculóide polar
TTs	- Tuberculóide subpolar
UFMG	- Universidade Federal de Minas Gerais
V	- Virchowiano
VV	- Virchowiano polar
VVs	- Virchowiano subpolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 INTRODUÇÃO	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA	21
2.2.1 Fontes de Infecção e Transmissão.....	25
2.3 ETIOLOGIA	25
2.3.1 Álcool-ácido resistência	26
2.4 DIAGNÓSTICO	27
2.5 CLASSIFICAÇÃO	28
2.6 BACILOSCOPIA	31
2.6.1 Coleta do material	33
2.6.2 Coloração	34
2.6.3 Microscopia	38
2.6.4 Índice Baciloscópio	38
2.6.5 Índice Morfológico	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 PACIENTES E MÉTODOS	43
4.1 DESENHO DO ESTUDO	43
4.2 PACIENTES	43
4.2.1 Critérios de Inclusão	43
4.2.2 Critérios de Exclusão	44
4.2.3 Critérios de Perda.....	44
4.3 MÉTODOS	44
4.3.1 Coleta do Material para Baciloscopia	44
4.3.1.1 Material necessário.....	44
4.3.1.2 Sítios de coleta.....	45
4.3.1.3 Técnica de coleta.....	46
4.3.2 Fixação.....	46
4.3.3 Coloração	47
4.3.3.1 Técnica de Ziehl-Neelsen	47
4.3.3.2 Técnica da Auramina O	47
4.3.4 Microscopia	47
4.3.5 Classificação.....	49
4.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS	49
4.5 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS	50
4.5.1 Análise Descritiva e Exploratória.....	50
4.5.2 Estudos de Concordância.....	50
4.5.2.1 Coeficiente Kappa.....	50
4.5.2.2 Coeficiente de Correlação Intraclasse.....	51
4.5.3 Teste de McNemar.....	52

4.5.4 Teste <i>t</i> para amostras emparelhadas.....	52
4.5.5 Correlação de Spearman.....	53
4.5.6 Teste Qui Quadrado.....	53
4.5.7 Curva ROC.....	53
4.5.8 Regressão Logística.....	54
4.5.8.1 Análise Bivariada.....	54
4.5.8.2 Análise Multivariada.....	54
4.6 CÁLCULO DO PODER DO TESTE.....	55
4.7 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	55
4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	56
5 RESULTADOS.....	58
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	58
5.2 ESTUDO DA CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR.....	59
5.2.1 Aplicabilidade clínica da baciloscopia.....	59
5.2.2 Aspectos laboratoriais.....	60
5.3 ANÁLISE ENTRE OS MÉTODOS DE COLORAÇÃO E ENTRE OS SÍTIOS.....	62
5.3.1 Correlação entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O.....	62
5.3.2 Concordância entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e entre os sítios.....	64
5.3.2.1 Aplicabilidade clínica da baciloscopia.....	64
5.3.2.2 Aspectos laboratoriais.....	65
5.4 CONCORDÂNCIA ENTRE BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL.....	67
5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO DE MADRID.....	68
5.6 FATORES ASSOCIADOS COM A POSITIVIDADE DA BACILOSCOPIA.....	69
5.6.1 Análise Bivariada.....	69
5.6.2 Análise Multivariada.....	71
6 DISCUSSÃO.....	74
6.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	74
6.2 CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR.....	75
6.3 ANÁLISE ENTRE OS MÉTODOS DE COLORAÇÃO E ENTRE OS SÍTIOS.....	77
6.4 BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL.....	80
6.5 BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO DE MADRID.....	82
6.6 FATORES ASSOCIADOS À POSITIVIDADE DA BACILOSCOPIA.....	83
7 CONCLUSÃO.....	86
8 LIMITAÇÕES.....	88
9 PROPOSIÇÕES.....	90
REFERÊNCIAS	92
APÊNDICES	101
ANEXOS	128

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é doença infectocontagiosa de evolução lenta, causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), parasita intracelular obrigatório com predileção por células da pele e dos nervos periféricos (BECHELLI; CURBAN, 1975; VOGELSANG, 1978; OPROMOLLA, 2000).

Apesar de ser uma das doenças mais antigas da humanidade, ainda representa importante problema de saúde pública mundial (PORICCHA, 2001; USTIANOWSKI; LOCKWOOD, 2003). O Brasil ocupa o segundo lugar em número de casos, apresentando altas taxas de prevalência nas regiões norte, nordeste e centro-oeste (ARAÚJO, 2003; WHO, 2007a).

As deformidades e incapacidades secundárias ao envolvimento neural são responsáveis pelo estigma social que envolve a doença (BRITTON; LOCKWOOD, 2004; MEIMA et al., 2004). O método mais efetivo na prevenção do dano neural é o diagnóstico precoce, havendo, pois, necessidade de métodos laboratoriais que possam melhorar a detecção do agente etiológico na pele (SUMMARY..., 2002).

O diagnóstico baseia-se nos sinais e sintomas característicos da doença. Um caso de hanseníase é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) pela presença de um ou mais dos seguintes critérios (BRASIL, 2000, 2002): lesão(ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo(s) com espessamento neural; baciloscopia positiva.

A classificação da doença determina o tipo e a duração do tratamento (NORMAN et al., 2004). A OMS e o Ministério da Saúde do Brasil (MS) sugerem, para efeitos operacionais de alocação em esquemas terapêuticos, que os pacientes sejam classificados com base no número de lesões cutâneas em paucibacilares (PB), quando apresentam até cinco lesões, e multibacilares (MB), quando mais de cinco (BRASIL, 2002). O critério clínico proposto permite o controle da doença em localidades onde a baciloscopia não é disponível (BRASIL, 2000).

A confirmação etiológica depende principalmente do exame baciloscópico, que auxilia no diagnóstico de casos difíceis e de recidivas, no diagnóstico diferencial das formas bacilíferas, e na classificação da doença (MARTINS et al., 1991; WATERS, 2002). Algumas formas clínicas de hanseníase exibem

baciloscopia negativa, portanto, um resultado negativo não exclui a doença. Por outro lado, exame baciloscópico positivo é certeza de diagnóstico da forma multibacilar (BRASIL, 2001).

Dois métodos de coloração se destacam na identificação dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), a carbolfucsina – Ziehl-Neelsen – e o fluorocromo Auramina O, sendo o primeiro de referência para a detecção do *M. leprae* (MANSFIELD, 1970; COSTA et al., 1988; SOMOSKÖVI et al., 2001). Considerando a importância da baciloscopia como instrumento auxiliar, vários estudos têm sido realizados comparando essas técnicas. Os resultados, no entanto, têm se mostrado controversos (HENDERSON et al., 1942; PRENDES et al., 1953; MANSFIELD, 1970; LOPES DE FARIA, 1974; JARIWALA; KELKAR, 1979; COLLINS et al., 1980; HARDAS; LELE, 1981; BHATIA et al., 1987; MARTINS et al., 1991; NAYAK et al., 2003).

A microscopia de fluorescência é considerada, por alguns autores, mais sensível que os métodos tradicionais baseados na carbolfucsina (JARIWALA; KELKAR, 1979; BHATIA et al., 1987; NAYAK et al., 2003), em particular, nos pacientes PB, considerando que a utilização de lentes de menor aumento e contraste fluorescente possibilita maior campo de visão, maior facilidade e menor tempo de leitura em relação à técnica de Ziehl-Neelsen (GOHAR, 1952; KHANOLKAR; NERURKAR, 1956; JARIWALA; KELKAR, 1979; BHATIA et al., 1987; NAYAK et al., 2003). Outros estudos, entretanto, mostram concordância elevada entre as técnicas ou superioridade da carbolfucsina (LOPES DE FARIA, 1974; HARDAS; LELE, 1981; MARTINS et al., 1991).

Considerando os resultados discordantes entre os diversos autores, optou-se por realizar um estudo comparativo entre a coloração fluorescente e o tradicional Ziehl-Neelsen em esfregaços de raspado dérmico de pacientes com hanseníase, na tentativa de contribuir para seu diagnóstico. A utilização, por alguns serviços de referência, de seis sítios de coleta para a realização da baciloscopia, e não quatro sítios como padronizado pelo MS, justifica a determinação da melhor metodologia relacionada à positividade do exame.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é doença infecciosa de evolução crônica, causada pelo *M. leprae*, que envolve primariamente a pele, os nervos periféricos e, ocasionalmente, outros órgãos e sistemas (VOGELSANG, 1978; PFALTZGRAFF; BRYCESON, 1985; SOUZA, 1997). O comprometimento dos nervos periféricos é a característica principal da doença, o que lhe confere grande potencial para provocar incapacidades e deformidades físicas (PFALTZGRAFF; BRYCESON, 1985; MEIMA et al., 2004). O diagnóstico precoce e o reconhecimento imediato dos quadros reacionais garantem a interrupção da cadeia de transmissão e a prevenção das incapacidades físicas (LOMBARDI, 1990).

O período de incubação varia de meses a 30 anos, sendo, em média, de dois a cinco anos (NOORDEEN, 1985). Esse longo período é devido à característica do *M. leprae* de se reproduzir lentamente por divisão binária, sendo necessários vários anos para que um indivíduo susceptível possa atingir carga bacilar suficiente para expressar a doença clinicamente manifesta (OPROMOLLA, 2000). Há predominância do sexo masculino após a puberdade, com uma relação homem:mulher de 1,5-2:1 (ULRICH et al., 1993; PFALTZGRAFF, 2003; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; MURTHY, 2004).

O bacilo apresenta alta infectividade, ou seja, infecta grande número de pessoas, porém apenas algumas adoecem devido à sua baixa patogenicidade (BECHELLI; CURBAN, 1975; FINE, 1982; RIDLEY; JOB, 1985). Vários estudos têm demonstrado que, diante da contaminação, a maioria dos indivíduos oferece resistência ao *M. leprae*, não desenvolvendo a doença, situação que pode ser alterada, em função da relação entre agente, meio ambiente e hospedeiro. Nos indivíduos que adoecem, a infecção evolui de maneiras diversas, de acordo com a resposta imunológica do hospedeiro (HARBOE, 1985). As apresentações clínicas estão correlacionadas com padrões imunológicos distintos, variando de uma forma localizada e não-contagiosa da doença, caracterizada por vigorosa resposta imune ao *M. leprae* mediada por células, a uma forma difusa e contagiosa, caracterizada por ausência de resposta celular específica aos antígenos do bacilo e predomínio da resposta humoral. Entre esses dois extremos, tuberculóide e virchowiano, encontram-se as formas intermediárias, que refletem graus variados de resistência

ao bacilo (PFALTZGRAFF; BRYCESON, 1985; RIDLEY; JOB, 1985; SOUZA, 1997; GOULART et al., 2002).

A hanseníase é única em seu espectro clínico, histopatológico e imunológico, sendo uma doença com manifestações polimorfas que necessitam ser diagnosticadas precocemente e interpretadas corretamente para fins de conduta terapêutica (SINGH et al., 2000). Além disso, a classificação correta da doença é de suma importância para o tratamento e controle da endemia.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A hanseníase é considerada importante problema de saúde pública pela sua capacidade de causar incapacidades permanentes, com conseqüências sociais de discriminação e estigma (MOSCHELLA, 2004). É doença de notificação compulsória do sistema de vigilância dos países endêmicos, ou seja, que apresentam um ou mais doentes para cada 10.000 habitantes (BRASIL, 1994, 2002).

As estratégias de controle da doença vêm passando por várias reformulações nos últimos quarenta anos e, após o advento da poliquimioterapia na década de 80, ampliou-se a possibilidade de sua eliminação. A partir de 1991, a meta proposta pela OMS passou a ser a eliminação da doença como problema de saúde pública, tendo como objetivo atingir uma taxa de prevalência de menos de um caso em cada 10.000 habitantes (BRASIL, 1994; TALHARI; NEVES, 1997; BRASIL, 2001; MEIMA et al., 2004; WHO, 2006). Pretende-se reduzir a taxa de detecção e de prevalência da doença através do diagnóstico e tratamento precoces, interrompendo-se, assim, a cadeia de transmissão (LÓPEZ-ANTUÑANO, 1998; SUMMARY..., 2002; MOSCHELLA, 2004; WHO, 2006).

Ao longo das últimas décadas, as taxas de prevalência global têm declinado ano a ano, resultado da consolidação do tratamento poliquimioterápico e da meta de eliminação, que vem sendo alcançada em vários países. De 12 milhões de pacientes com hanseníase no mundo em 1981, a prevalência caiu para 3.997.992 casos em 1985 e 597.232 casos no ano de 2000 (MOSCHELLA, 2004; WHO, 2006).

Apesar da diminuição na prevalência mundial, as taxas de detecção de casos novos têm se mantido elevadas (PORICHHA, 2001; ARAÚJO, 2003; MEIMA et al., 2004; MOSCHELLA, 2004). Possível razão para esse fato seria o aumento na detecção de casos devido aos programas de controle e a manifestação dos sinais clínicos da doença após o longo período de incubação, entre outras (PORICHHA, 2001; MOSCHELLA, 2004). No início de 2007, existiam no mundo 231.361 casos registrados de hanseníase, e foram diagnosticados 265.661 casos novos (WHO, 2007b), como pode ser observado na tabela 1.

TABELA 1
Prevalência e detecção da hanseníase no início de 2007, por região da OMS
(excluindo a Europa)

Região da OMS	Prevalência registrada no início 2007	Casos novos detectados em 2006
	n (taxa de prevalência*)	n (taxa de detecção**)
África	36.124 (0,52)	34.480 (4,92)
Américas	64.715 (0,76)	47.612 (5,58)
Sudeste Asiático	116.663 (0,70)	174.118 (10,51)
Mediterrâneo Oriental	3.986 (0,09)	3.261 (0,71)
Pacífico Ocidental	9.873 (0,06)	6.190 (0,35)
Total	231.361	265.661

Fonte: WHO Global Leprosy Situation, nov. 2007

Nota: N: número de casos; *número de casos/10.000 habitantes; **número de casos novos/100.000 habitantes

Em 2005, a hanseníase era problema de saúde pública nos seguintes países: República Democrática do Congo, Moçambique, Nepal, Brasil, Madagascar, Tanzânia, Angola, República Centro Africana e Índia (WHO, 2006). Em 2006, os últimos três atingiram a meta de eliminação, permanecendo a endemia em seis países: República Democrática do Congo, Moçambique, Nepal, Brasil, Madagascar e Tanzânia (WHO, 2006). Atualmente, apenas quatro dos 122 países em 1985 ainda não atingiram a meta de eliminação da hanseníase. São eles o Brasil, a República Democrática do Congo, Moçambique e Nepal (WHO, 2007a). A tabela 2 apresenta as taxas de prevalência e de detecção desses países.

TABELA 2
Número e taxa de prevalência e detecção da hanseníase nos países que ainda não alcançaram a meta de eliminação da hanseníase

País	Prevalência registrada		Número de casos novos detectados	
	n (taxa de prevalência*)		n (taxa de detecção**)	
	Início 2005	Início 2007	2004	2006
Brasil	30.693 (1,7)	60.567 (3,2)	49.384 (26,9)	44.436 (23,5)
República Democrática do Congo	10.530 (1,9)	8.261 (1,4)	11.781 (21,1)	8.257 (13,9)
Moçambique	4.692 (2,4)	2.594 (1,3)	4.266 (22,0)	3.637 (18,0)
Nepal	4.699 (1,8)	3.951 (1,4)	6.958 (26,2)	4.253 (15,4)

Fonte: Adaptado de WHO Global Leprosy Situation, jun. 2007

Nota: N: número de casos; *número de casos/10.000 habitantes; **número de casos novos/100.000 habitantes

O Brasil é o país responsável pela endemia no continente americano e está entre os 12 países que registraram 90% dos casos no mundo, ocupando a posição incômoda de segundo lugar em número absoluto de casos de hanseníase no *ranking* mundial, perdendo apenas para a Índia (WHO, 2007a). No final de 2005, foi registrado coeficiente de prevalência da hanseníase de 1,48 casos/10.000 habitantes e coeficiente de detecção de casos novos de 2,09/10.000 habitantes (BRASIL, 2006b). No início de 2007, houve aumento significativo das taxas de prevalência e detecção, com 60.567 casos registrados, ou 3,21/10.000 habitantes e índice de detecção de 44.436 casos novos, ou 2,35/10.000, considerado muito alto (WHO, 2007a). O *Plano Estratégico para Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010* foi, então, desenvolvido, visando intensificar as ações de eliminação e de vigilância resolutiva e contínua, com o objetivo de atingir uma prevalência abaixo de um caso por 10.000 habitantes, em nível nacional (BRASIL, 2006b).

A doença é endêmica em todo o território nacional, embora com distribuição irregular. As regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste são as que apresentam as maiores taxas de prevalência e detecção da doença (BRASIL, 2006b; SISTEMA..., 2006). A prevalência, no início de 2006, era de 1,11 casos/10.000 habitantes no Estado de Minas Gerais e 0,29 casos/10.000 em Belo Horizonte (SISTEMA..., 2006). A tabela 3 mostra a situação da hanseníase no Brasil, segundo Unidade Federada, em 2006.

A estimativa da proporção de pacientes com incapacidades físicas (grau I e II), entre os casos detectados, é conhecida como prevalência oculta e tem sido proposta como indicador epidemiológico para avaliar o atraso no diagnóstico da hanseníase (LEBOEUF; GROSSI, 2000). Em Minas Gerais, estimou-se uma prevalência oculta de 24,9% de casos de hanseníase no período de 2000 a 2005 (MOSCHIONI, 2006).

TABELA 3
Detecção e prevalência da hanseníase, segundo Unidade Federada – Brasil, 2006

UF	DETECÇÃO		PREVALÊNCIA	
	Número casos	Taxa detecção (por 10.000)	Prevalência absoluta	Taxa Prevalência (por 10.000)
NORTE	8.663	5,77	5.677	3,78
RO	1.262	8,08	884	5,66
AC	491	7,15	203	2,96
AM	751	2,27	569	1,72
RR	406	10,07	254	6,30
PA	4.282	6,02	2.830	3,98
AP	154	2,50	102	1,66
TO	1.317	9,88	835	6,27
NORDESTE	15.239	2,95	9.938	1,93
MA	4.235	6,85	3.007	4,86
PI	1.221	4,02	724	2,38
CE	2.218	2,70	1.440	1,75
RN	263	0,86	163	0,54
PB	895	2,47	548	1,51
PE	2.841	3,34	1.798	2,11
AL	427	1,40	272	0,89
SE	471	2,35	301	1,50
BA	2.668	1,91	1.685	1,21
SUDESTE	7.637	0,96	5.184	0,652
MG	2.310	1,19	1.615	0,83
ES	1.155	3,33	727	2,10
RJ	2.213	1,42	1.514	0,97
SP	1.959	0,48	1.328	0,32
SUL	1.768	0,65	1.393	0,51
PR	1.400	1,35	1.087	1,05
SC	184	0,31	147	0,25
RS	184	0,17	159	0,15
CENTRO-OESTE	6.070	4,57	4.146	3,12
MS	541	2,35	373	1,62
MT	2.990	10,47	2.044	7,15
GO	2.304	4,02	1.574	2,75
DF	235	0,99	155	0,65
BRASIL	39.385	2,11	26.345	1,41

Fonte: SINAN. Disponível em: <http://www.who.int/lep/situation/Brasil-2006.pdf>

2.2.1 Fontes de Infecção e Transmissão

O homem é considerado o único reservatório natural do bacilo. Foi relatada a presença de animais silvestres naturalmente infectados, como tatus, chimpanzés e macacos, entretanto, esses animais não parecem desempenhar papel importante na cadeia de transmissão (GOULART et al., 2002).

Os pacientes portadores de formas MB são considerados a principal fonte de infecção (ARAÚJO, 2003). Há relatos da existência de portadores saudáveis, detectados através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que podem ser fonte de disseminação da doença, mas o papel desses indivíduos ainda não está bem definido (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

A transmissão da hanseníase se dá por contato íntimo e prolongado de indivíduos susceptíveis com pacientes bacilíferos não tratados (NOORDEEN, 1985). Contatos intradomiciliares de doentes com a forma virchowiana apresentam risco relativo de oito a 10 de desenvolver a doença (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). O tratamento poliquimioterápico é eficaz na interrupção da cadeia de transmissão, sendo que a primeira dose de rifampicina é capaz de matar as cepas viáveis do *M. leprae* em até 99,9% da carga bacilar de um indivíduo (BRASIL, 2002).

Admite-se que as vias aéreas superiores sejam a principal porta de entrada e via de eliminação do bacilo (NOORDEEN, 1985; ARAÚJO, 2003; BRITTON; LOCKWOOD, 2004). O contágio direto por via cutânea parece ser exceção, uma vez que o *M. leprae* não consegue atravessar a pele intacta (BRITTON; LOCKWOOD, 2004).

2.3 ETIOLOGIA

O agente etiológico da hanseníase – *M. leprae* – foi descoberto pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, em 1873 (VOGELSANG, 1978; REES, 1985). Pertence à família *Mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetales* e classe *Actinomycetes* (REES, 1985).

É bacilo álcool-ácido resistente, imóvel, não formador de esporos, parasita intracelular obrigatório, com predileção por células de Schwann e macrófagos (REES, 1985; SCOLLARD et al., 2006).

O *M. leprae* ainda não foi cultivado *in vitro*, o que constitui grande desafio para os microbiologistas. No entanto, consegue-se sua multiplicação pela inoculação no coxim plantar de camundongos imunocompetentes, naqueles irradiados e timentomizados ou em camundongos atímicos. Os bacilos também se reproduzem em tatus e macacos (REES, 1971, 1985; GOULART et al., 2002).

Em tecidos humanos, apresenta-se sob a forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado, medindo de 1,5 a 8,0 micra de comprimento por 0,2 a 0,5 micra de largura (REES, 1985; OPROMOLLA, 2000).

O bacilo multiplica-se lentamente por divisão binária, a cada 11 a 13 dias (REES, 1985). Dentre as micobactérias patogênicas, é a que apresenta tempo de multiplicação mais lento, o que resulta no longo período de incubação e na cronicidade da doença (REES, 1985; OPROMOLLA, 2000; GOULART et al., 2002).

2.3.1 Álcool-ácido resistência

A característica álcool-ácido resistência do bacilo, demonstrada pelo método de Ziehl-Neelsen, é baseada no fato de que o bacilo de Hansen, quando tratado pela fucsina fenicada, resiste à descoloração subsequente por uma solução de ácido forte e, assim sendo, permanece corado em vermelho. Isso se deve à presença de lipídios fortemente ligados em sua parede celular, que resistem à extração sucessiva do corante com álcool, éter e clorofórmio (COSTA et al., 1988).

A parede celular do bacilo de Hansen é um complexo covalentemente ligado de peptidoglicana – arabinogalactana - ácido micólico, semelhante à composição da parede celular de todas as micobactérias (REES, 1985; SCOLLARD et al., 2006). O glicopeptídeo se liga ao polissacarídeo de cadeia ramificada, arabinogalactana, através de ligações fosfodiéster. As terminações distais da arabinogalactana estão esterificadas com o ácido micólico. Os ácidos micólicos são ácidos graxos complexos, responsáveis pela natureza hidrofóbica da micobactéria (REES, 1985). O complexo glicopeptídeo - ácido micólico - arabinogalactana forma o esqueleto da parede celular micobacteriana. As cadeias de carbono dos ácidos micólicos estão intercaladas com as de numerosos lipídios e glicolipídios associados à parede. Os lipídios são responsáveis por 60% do peso seco da parede celular das micobactérias, o que dificulta sua coloração com

corantes de anilina básicos, como aqueles usados no método de Gram, necessitando de procedimentos especiais para a incorporação do corante (KONEMAN et al., 2001). Do mesmo modo, uma vez coradas, as micobactérias resistem à descoloração com álcool-ácido. (REES, 1985; KONEMAN et al., 2001).

2. 4 DIAGNÓSTICO

O MS estabeleceu três sinais cardinais para a definição de caso de hanseníase: lesão(ões) de pele com alteração de sensibilidade; acometimento de nervo(s) com espessamento neural e baciloscopia positiva na pele. O diagnóstico é feito na presença de um ou mais desses sinais (BRASIL, 2002).

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 (BRASIL, 2002).

A utilização do número de lesões cutâneas anestésicas como critério isolado para o diagnóstico da hanseníase não parece apropriado, já que cerca de 30% das lesões não são anestésicas, particularmente nos casos MB, que são a principal fonte de infecção e apresentam risco elevado de desenvolver incapacidades (USTIANOWSKI; LOCKWOOD, 2003; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; MOSCHELLA, 2004).

O espessamento neural geralmente aparece mais tardiamente que as lesões cutâneas. Esse critério é o mais subjetivo dos critérios clínicos para o diagnóstico, porém, a desconsideração do mesmo impossibilita o reconhecimento da forma neural pura da hanseníase (USTIANOWSKI; LOCKWOOD, 2003).

A baciloscopia é o exame complementar de maior utilidade, de fácil execução e de baixo custo na identificação do *M. leprae* diretamente de raspado dérmico das lesões hansênicas ou de outros locais de coleta selecionados, como lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos (BRASIL, 2002).

Testes diagnósticos, como exame histopatológico da pele lesada, inoculação em coxim de camundongos, testes sorológicos e métodos moleculares (PCR), estão limitados a serviços de referência e centros de pesquisa (KATOCH, 2002; MOSCHELLA, 2004).

Não existe padrão ouro de diagnóstico em hanseníase, pois seu agente etiológico não pode ser cultivado em meios sintéticos ou em culturas de células, e nem sempre é encontrado em exames bacterioscópicos, como a baciloscopia do raspado dérmico e a histopatologia. Nas formas PB, os bacilos dificilmente são detectados (BHATIA et al., 1987). A confirmação diagnóstica da hanseníase, portanto, continua um desafio, especialmente em casos PB.

2.5 CLASSIFICAÇÃO

Classificar uma doença é maneira de compreendê-la melhor e, com isso, obter maior êxito em seu tratamento e controle. A classificação da hanseníase determina o tipo e a duração do tratamento a ser efetuado (NORMAN et al., 2004). Da interação entre o *M. leprae* e o ser humano resultam diferentes manifestações clínicas, com grande variação nos sinais e sintomas, na evolução e no prognóstico da doença, refletindo o padrão da resposta imunológica do hospedeiro. Desse fato originaram inúmeras classificações ao longo de sua história (GROSSI, 2005). Serão mencionadas as mais freqüentes.

No VI Congresso Internacional de Hanseníase de Madrid, em 1953, foi proposta uma classificação a qual é aceita até hoje e é seguida na maioria dos serviços. São considerados critérios clínicos, compreendendo a morfologia das lesões cutâneas e as manifestações neurológicas, e baciloscópicos. Essa classificação é baseada no conceito de duas formas polares estáveis, tuberculóide e virchowiana, e duas formas instáveis, indeterminada e dimorfa, que, dependendo da imunidade do indivíduo, evoluem para um dos pólos (INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY, 1953). Apesar de ainda muito difundida, é considerada falha, uma vez que a baciloscopia não é realizada como rotina na maioria dos serviços de saúde (OPROMOLLA, 2000; GALLO et al., 2003).

Em 1966, Ridley e Jopling propuseram uma classificação para fins de pesquisa, baseada na resposta imunológica do hospedeiro ao bacilo e em critérios histopatológicos. A doença é considerada como um espectro que apresenta dois

grupos polares estáveis, tuberculóide polar (TT) e virchowiano polar (VV), e os interpolares, imunologicamente instáveis: tuberculóide subpolar (TTs), dimorfos – dimorfo-tuberculóide (DT), dimorfo-dimorfo (DD) e dimorfo-virchowiano (DV) – e, ainda, o virchowiano subpolar (VVs) (RIDLEY; JOPLING, 1966; OPROMOLLA; MARTELLI, 2005). Essa classificação não inclui a forma indeterminada no espectro. Cabe ressaltar que os termos dimorfo e virchowiano utilizados correspondem à tradução para o português de *borderline* e *lepromatous*, sendo, portanto, mais adequados no Brasil, onde o termo *lepra* foi abolido por lei federal em 1995 (OPROMOLLA; MARTELLI, 2005).

Com a introdução da poliquimioterapia em 1982, a OMS propôs uma classificação para fins operacionais baseada na classificação de Ridley & Jopling e na baciloscopia (MOSCHELLA, 2004). Os esquemas foram padronizados para dois grupos de pacientes, os PB e os MB. Foram considerados PB aqueles com a forma indeterminada (I), tuberculóide (TT) ou dimorfo-tuberculóide (DT) com índice baciloscópico (IB) inferior a dois ou negativo e MB os casos dimorfo-dimorfo (DD), dimorfo-virchowiano (DV) e virchowiano (VV) com IB igual ou superior a dois (SUMMARY..., 2002). Posteriormente, em 1988, o Sexto Relatório do Comitê de Consultores da OMS concluiu que, por razões clínicas e operacionais, todos os casos com baciloscopia positiva deveriam ser tratados como MB (OPROMOLLA, 2000; PORICHHA, 2001; SUMMARY..., 2002; GALLO et al., 2003; KEITA et al., 2003; GROSSI, 2005).

A tabela 4 mostra a correlação entre as classificações de Madrid (1953), de Ridley & Jopling (1966) e da OMS (1982), adotadas para a hanseníase.

TABELA 4
Correlação entre as classificações de Madrid, Ridley & Jopling e OMS adotadas para a hanseníase

Madrid	I	T	D	V	
Ridley e Jopling		TT	DT*	DD DV	VV
OMS	PAUCIBACILARES		MULTIBACILARES		

Fonte: Adaptado de Souza, 1997.

Nota: I: indeterminado; T: tuberculóide; D: dimorfo; V: virchowiano; TT: tuberculóide; DT: dimorfo-tuberculóide; DD: dimorfo-dimorfo; DV: dimorfo-virchowiano; VV: virchowiano. *Operacionalmente, DT é classificado como paucibacilar pela OMS para fins de tratamento, se baciloscopia negativa.

Tendo em vista a dificuldade de se estabelecer avaliação bacteriológica de qualidade em muitos programas de controle, a estratégia foi simplificada, com a introdução de critérios essencialmente clínicos para o diagnóstico e classificação da hanseníase (PORICHHA, 2001; SUMMARY..., 2002; WATERS, 2002; GALLO et al., 2003). A OMS adotou uma classificação baseada no número de lesões cutâneas e de nervos acometidos para a alocação do paciente nos esquemas poliquimioterápicos (WHO, 1997; GALLO et al., 2003). Foram considerados PB os casos de hanseníase com até cinco lesões cutâneas e/ou apenas um nervo acometido, e MB os casos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um nervo acometido. O exame baciloscópico, considerado opcional, quando positivo classificaria o paciente como MB.

A partir de 2000, a OMS passou a adotar apenas o número de lesões cutâneas na classificação dos doentes, considerando PB aqueles com até cinco lesões e MB aqueles com mais de cinco lesões (WHO, 2000). Em 2002, o MS recomenda a adoção desse critério no Guia para o Controle da Hanseníase (BRASIL, 2002). A baciloscopia, quando disponível, é utilizada como exame complementar, classificando o paciente como MB quando positiva (BRASIL, 2001, 2002). De acordo com esse critério, a distribuição de pacientes MB entre os doentes de hanseníase foi de 39,5% no Brasil, 35,6% no Nepal e 19,4% na Nigéria (BÜHRER-SÉKULA et al., 2007).

A classificação sugerida pela OMS e adotada pelo MS – classificação operacional – baseada essencialmente em critérios clínicos, vem sendo analisada por vários autores (BECX-BLEUMINK, 1991; RAMESH; PORICHHA, 1996; WHO, 1997; GALLO et al., 2003; CRIPPA et al., 2004; NORMAN et al., 2004; GROSSI, 2005). Comparando-se a classificação operacional com o exame baciloscópico, estudos evidenciaram concordância leve, com Kappa de 0,40 (KEITA et al., 2003), moderada, com Kappa de 0,66 (BÜHRER-SÉKULA et al., 2000) e substancial, com Kappa de 0,68 (GALLO et al., 2003). No entanto, essa classificação superestima os casos MB (NORMAN et al., 2004; GROSSI, 2005).

Bührer-Sékula et al. (2000) e Norman et al. (2004) observaram sensibilidade de 85% e 88,6% e especificidade de 81% e 86,7% da classificação operacional quando comparada à baciloscopia, respectivamente.

Os diferentes sistemas de classificação clínica apresentam disparidades na capacidade de detectar os pacientes MB – sensibilidade – e identificar

corretamente os PB – especificidade (RAMESH; PORICHHA, 1996; GALLO et al., 2003; CRIPPA et al., 2004).

O ML Flow é um teste imunocromatográfico, simples e rápido, que vem sendo estudado nos últimos anos como método classificatório. Detecta anticorpos IgM contra o glicolípido fenólico 1 (PGL-1), específico do *M. leprae* e, por refletir a carga bacilar, auxilia na classificação das formas clínicas de hanseníase em PB e MB para fins de tratamento (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; OSKAM et al., 2003). A grande maioria dos pacientes PB é soronegativa, enquanto a maioria dos MB é soropositiva; o teste apresenta sensibilidade de 97,4% e especificidade de 90,2% (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). Em Belo Horizonte, observou-se associação estatisticamente significativa entre o resultado do teste sorológico ML Flow e o resultado da baciloscopia, com concordância moderada (Kappa: 0,49) entre os exames (LYON, 2005). Em Minas Gerais, a incorporação do teste como instrumento auxiliar na classificação contribuiu para a classificação dos casos novos de hanseníase, com implicação direta e benéfica no tratamento e controle da epidemia (GROSSI, 2005). Para fins de terapêutica, o teste sorológico também pode prevenir tratamento possivelmente insuficiente em casos clinicamente PB que apresentam sorologia positiva, e tratamento possivelmente excessivo em pacientes clinicamente MB com sorologia negativa (GROSSI, 2005; LYON, 2005; BÜHRER-SÉKULA et al., 2007).

2.6 BACILOSCOPIA

O exame baciloscópico do raspado dérmico representa tradicionalmente um dos sinais cardinais da hanseníase. Quando positivo, demonstra a presença da micobactéria e indica os pacientes mais infectantes (BRITTON; LOCKWOOD, 2004). Sua especificidade é próxima a 100%, entretanto, apresenta baixa sensibilidade, uma vez que é negativo em até 70% dos pacientes de hanseníase (LÓPEZ-ANTUÑANO, 1998; SOMOSKÖVI et al., 2001; USTIANOWSKI; LOCKWOOD, 2003; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; MOSCHELLA, 2004).

Em Belo Horizonte, a baciloscopia foi positiva em 35,9% dos 135 casos novos de hanseníase atendidos de novembro de 2002 a março de 2004 em serviço de referência (LYON, 2005). Em Minas Gerais, estudos mostram positividade de 27% (GROSSI, 2005) e 34,9% (MOSCHIONI, 2007).

No Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, no Rio de Janeiro, a baciloscopia foi positiva em 77,9% dos 837 casos novos de hanseníase atendidos no período de 1986 a 1999 (GALLO et al., 2003). Na Fundação Alfredo da Mata, em Manaus, o exame baciloscópico foi positivo em 28,3% dos 628 casos novos de hanseníase diagnosticados de janeiro de 2000 a março de 2001 (CRIPPA et al., 2004).

No Serviço de Pesquisa e Treinamento de Hanseníase em Karigiri, na Índia, a baciloscopia foi positiva em 8,8% dos 5.165 casos novos de hanseníase registrados entre 1985 e 2000 (NORMAN et al., 2004). Em estudo no Mali, África, dos 200 casos novos de hanseníase, a baciloscopia foi positiva em 31,5% (KEITA et al., 2003).

A sensibilidade do método é influenciada por múltiplos fatores, como técnica de coleta da amostra, número de micobactérias presentes, qualidade do esfregaço, técnica de coloração e modo de interpretação do exame. É recomendável que um resultado negativo seja liberado apenas após a observação de, no mínimo 100 e, preferencialmente, 300 campos de visão (SOMOSKÖVI et al., 2001). Em laboratórios com padronização técnica e controle de qualidade adequado, a baciloscopia é considerada apropriada (PORICHHA, 2001; NORMAN et al., 2004).

A técnica é relativamente simples e de fácil execução, porém, apresenta problemas de ordem operacional em vários programas de controle da hanseníase, como baixa qualidade dos exames, deficiente infra-estrutura e escassez de profissionais interessados na realização dos mesmos, além da inexistência desse serviço em vários centros de saúde (WATERS, 2002). Quando executada por técnicos experientes, os resultados são reprodutíveis (GUPTE et al., 1988; DESIKAN et al., 2006).

O exame baciloscópico apresenta grande utilidade, especialmente no diagnóstico dos pacientes MB, na confirmação diagnóstica de casos difíceis, no diagnóstico diferencial das formas MB com doenças como sífilis secundária, linfoma com comprometimento cutâneo e micose fungóide, e no diagnóstico e acompanhamento de recidivas. Além disso, é o mais acurado método para classificar a hanseníase, devendo estar disponível ao menos nos centros de referência (PORICHHA, 2001; BRASIL, 2002; SUMMARY..., 2002; WATERS, 2002).

2.6.1 Coleta do material

A coleta do material é passo crucial para o sucesso da baciloscopia. O procedimento foi padronizado pelo MS, com o objetivo de se coletar material biológico com representatividade.

A escolha dos sítios de coleta deve ser baseada nos locais mais prováveis de encontro do bacilo, considerando que o *M. leprae* apresenta tropismo pelas regiões anatômicas mais frias (REES, 1971; KAUR et al., 1980). O lóbulo auricular é o local de maior concentração de bacilos, quando comparado com cotovelos, joelhos e falanges distais (KAUR et al., 1980; KUMAR; KAUR, 1986; SUJAI et al., 1997).

O MS preconiza a realização do procedimento em quatro sítios, dando-se preferência ao raspado dérmico de lesão ativa ou área com alteração de sensibilidade, além dos lóbulos auriculares e do cotovelo contralateral à lesão. Na ausência desta, deve-se colher material de ambos os lóbulos e cotovelos (BRASIL, 1989a, 1989b, 1994, 2001, 2002). Alguns serviços de referência, no entanto, realizam a pesquisa de BAAR em seis sítios, como era preconizado anteriormente (REES, 1985; TALHARI; NEVES, 1997; OPRMOLLA, 2000). Entre eles, o Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, no Rio de Janeiro e o Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, São Paulo, que utilizam esfregaços de lóbulos auriculares, cotovelos e joelhos ou, na presença de lesões de pele, lóbulos, cotovelos, lesão cutânea e joelho contralateral (GALLO et al., 2000; GALLO et al., 2003; LASTÓRIA et al., 2006).

Em Karigiri, na Índia, estudo visando determinar o menor número de sítios de coleta necessário para detectar os pacientes com baciloscopia positiva mostrou que a combinação de lóbulos auriculares e lesão cutânea ativa é capaz de detectar 95,5% dos pacientes (SUJAI et al., 1997).

O exame da mucosa nasal, preconizado no passado, não é recomendado, uma vez que não oferece vantagem em relação aos atuais sítios, causa dor e sangramento, pode resultar falso-positivo pela presença de micobactérias saprófitas da flora local, além do fato de essa região se tornar positiva mais tardiamente em relação a outros sítios (BRASIL, 1989b).

2.6.2 Coloração

A natureza ácido resistente do bacilo pode ser determinada por dois tipos de coloração, a carbolfucsina – Ziehl-Neelsen ou Kinyoun – e o fluorocromo – Auramina O ou Auramina-Rodamina (SIQUEIRA et al., 1984). Os ácidos micólicos existentes na parede celular das micobactérias têm a capacidade de se ligar aos corantes fucsina e Auramina O, resistindo à descoloração com álcool-ácido. Um corante de contraste é empregado para destacar o organismo corado e facilitar seu reconhecimento ao microscópio (COSTA et al., 1988).

A carbolfucsina permanece como técnica de coloração de referência, sendo o Ziehl-Neelsen o método adotado no Brasil para todos os níveis de laboratório e de custo mais barato (MANSFIELD, 1970; COSTA et al., 1988; SOMOSKÖVI et al., 2001). Descrito por Ziehl e Neelsen, em 1883, é também conhecido como método de “coloração a quente”, uma vez que utiliza o calor para facilitar a penetração do corante fucsina através da parede celular (SIQUEIRA et al., 1984). A coloração de Kinyoun é variante conhecida como “coloração a frio” e se baseia no fato de que a alta concentração de fenol presente no reagente “dissolve” o material lipídico da parede celular, permitindo a penetração da fucsina sem a utilização de calor. Uma vez corada, a parede celular retém o corante, o que lhe confere a característica cor vermelha contra um fundo azul, se o corante de contraste usado for o azul-de-metileno, ou verde, se o verde-brilhante for o corante de contraste empregado (KONEMAN et al., 2001). A utilização do corante à temperatura ambiente é preferível, uma vez que o aquecimento desmedido pode danificar a amostra (REES, 1985).

O termo fluorescência refere-se à propriedade que certos organismos apresentam de emitir luz de comprimento de onda diferente quando irradiados (PRENDES et al., 1953). Pode-se produzir fluorescência em organismos que naturalmente não a têm, tratando-os com uma substância denominada fluorocromo e expondo-os à luz ultravioleta. A microscopia de fluorescência se baseia na utilização do fluorocromo como corante, que absorve luz de determinado comprimento de onda e converte em energia luminosa de comprimento de onda menor (MATTHAEI, 1950).

A descrição da microscopia fluorescente na técnica bacteriológica foi feita por Hagemann, em 1937, através da coloração de bacilos com sulfato de berberino fenolado (HENDERSON et al., 1942; VON HAEBLER; MURRAY, 1954;

OLIVA, 1958). Esse mesmo autor, em 1938, e Richards e Miller, em 1941, testaram a Auramina como fluorocromo, com resultados satisfatórios (RICHARDS; MILLER, 1941).

A adição de Rodamina à Auramina foi introduzida por Hughes em 1946. Essa combinação concede tom avermelhado à imagem amarelo-fluorescente, melhorando o contraste e, conseqüentemente, facilitando a visualização dos bacilos (KUPER; MAY, 1960). Matthaei (1950) fez algumas modificações técnicas em relação à microscopia, considerando fonte luminosa, filtros, condensadores e tipo de microscópio e aumentou a concentração dos corantes utilizados. Posteriormente, Kuper e May (1960) aperfeiçoaram a técnica e estabeleceram a contracoloração com solução de permanganato de potássio. Finalmente, Silver et al. (1966) introduziram novas modificações no processo e no tempo de coloração com Auramina e Rodamina.

Mansfield (1970) demonstrou que a coloração pela Auramina isolada é tão eficaz quanto os métodos com múltiplos fluorocromos, mas a morfologia dos bacilos é mais bem estudada através da primeira técnica. O método da Auramina-Rodamina produz bacilos com duas tonalidades ou com coloração irregular, podendo interferir na interpretação de sua morfologia (MANSFIELD, 1970).

Os esfregaços corados com fluorocromo podem ser observados ao microscópio de fluorescência com objetiva de 25X a 40X, ao contrário daqueles corados pelo método da carbolfucsina, que necessitam ser analisados com objetiva de imersão (MATTHAEI, 1950; VON HAEBLER; MURRAY, 1954; KONEMAN et al., 2001). O primeiro método utiliza aumentos relativamente pequenos e, portanto, a visão de um campo maior, permitindo assim examinar todo o esfregaço com maior facilidade e rapidez. Além disso, o contraste dos microrganismos fluorescentes brilhando contra o fundo escuro facilita sua detecção em menores ampliações, reduzindo a fadiga do observador e aumentando a acurácia do exame (RICHARDS; MILLER, 1941; MATTHAEI, 1950; GOHAR, 1952; VON HAEBLER; MURRAY, 1954; OLIVA, 1958; KUPER; MAY, 1960; COLLINS et al., 1980; ROBLEDO; MEJÍA, 2001). Resultados confiáveis podem ser obtidos através de técnica adequada e exame metuculoso (KUPER; MAY, 1960).

A microscopia de fluorescência tem sido amplamente utilizada há vários anos para a detecção de *Mycobacterium tuberculosis* em escarro, sendo

considerada o primeiro e mais rápido passo para o diagnóstico da tuberculose (BOGEN, 1941; FREIMAN; MOKOTOFF, 1943; TRUANT et al., 1962; KOCH; COTE, 1965; SILVER et al., 1966; SINGH; PARIJA, 1998; ROBLEDO; MEJÍA, 2001; SOMOSKÖVI et al., 2001; MURRAY et al., 2003). Somoskövi et al. (2001) analisaram o desempenho e os parâmetros técnicos dos diferentes métodos de coloração de micobactérias em lâminas pré-fabricadas, demonstrando maior sensibilidade da microscopia fluorescente em relação à carbolfucsina e superioridade da Auramina-Rodamina em relação à Auramina isolada. Estudos comparativos entre os métodos fluorescente e de Ziehl-Neelsen em secreções pulmonares demonstraram, também, maior sensibilidade do primeiro método e especificidade semelhante (NIERO et al., 1978; SINGH; PARIJA, 1998). Outros autores observaram que o método fluorescente é mais sensível, entretanto, sua especificidade é menor, pela possibilidade de resultados falso-positivos (LIND, 1949; VON HAEBLER; MURRAY, 1954; OLIVA, 1958).

O aperfeiçoamento e a implementação de técnicas e procedimentos para o exame baciloscópico em hanseníase têm sido freqüente objeto de estudo, por ser este até o momento o principal recurso bacteriológico utilizado para o diagnóstico e o controle dessa doença (COSTA et al., 1988).

Gohar (1952) e Khanolkar e Nerurkar (1956) descreveram as vantagens da microscopia de fluorescência pela técnica da Auramina na detecção do *M. leprae* em raspado de mucosa nasal e em cortes histológicos, respectivamente, considerando rapidez e facilidade de execução do método. Collins (1980) observou que, com esse método, o número de bacilos contados é maior. Parece ser útil especialmente nos casos PB, que apresentam escassez de bacilos (GOHAR, 1952; KHANOLKAR; NERURKAR, 1956; JARIWALA; KELKAR, 1979; BHATIA et al., 1987; NAYAK et al., 2003).

Estudos comparativos entre os dois métodos de coloração para a detecção do bacilo da hanseníase são realizados principalmente em cortes histológicos e mostram resultados divergentes. Mansfield (1970) demonstrou alto grau de concordância entre os métodos, enquanto outros autores revelaram superioridade da microscopia de fluorescência em relação ao Ziehl-Neelsen (HENDERSON et al., 1942; MANSFIELD, 1970; JARIWALA; KELKAR, 1979; BHATIA et al., 1987; NAYAK et al., 2003). Em contraste, Lopes de Faria (1974) e Hardas e Lele (1981) observaram maior eficácia da carbolfucsina. Entre os problemas detectados, ressaltou-se a presença de artefatos nas lâminas coradas pelo método

fluorescente (HARDAS; LELE, 1981; SOMOSKÖVI et al., 2001). Deve-se considerar, entretanto, que a sensibilidade nesses estudos variou consideravelmente.

Bathia et al. (1987) demonstraram casos PB com biópsias cutâneas negativas pelo método de Ziehl-Neelsen que apresentaram positividade pela técnica da Auramina, ressaltando a importância desse método de coloração quando há escassez de bacilos.

Em relação ao exame realizado a partir de esfregaços de raspado dérmico, há poucos estudos comparando as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina. O. Prendes et al. (1953) demonstraram superioridade do método fluorescente em relação ao clássico Ziehl-Neelsen, pela maior rapidez e facilidade da técnica e da leitura dos resultados, além de maior clareza na visualização dos bacilos. Mansfield (1970) e Martins et al. (1991) obtiveram resultados concordantes quanto à evidenciação dos bacilos. Os últimos autores demonstraram, ainda, maior eficácia do método fluorescente na determinação do IB (MARTINS et al., 1991). Em contraste, Hardas e Lele (1981) observaram melhores resultados com a carbolfucsina; a microscopia de fluorescência detectou apenas os bacilos íntegros e mistos, enquanto os bacilos granulados não foram reconhecidos pela dificuldade na sua diferenciação com artefatos, justificando a baixa positividade do exame nesse estudo.

A coloração pelo fluorocromo tem a vantagem da facilidade e rapidez na identificação de bacilos em menor ampliação, principalmente quando se encontram em pequeno número. Entretanto, a presença de artefatos ocorre com frequência, aumentando a probabilidade de resultados falso-positivos (VON HAEBLER; MURRAY, 1954; HARDAS; LELE, 1981). A experiência do profissional é de suma importância na decisão do que é e o que não é artefato (SILVER et al., 1966). Geralmente os artefatos se coram palidamente, enquanto os bacilos apresentam fluorescência amarelo brilhante. O sucesso desse método depende do processo de descoloração que, quando curto, falha em descorar organismos não-ácido resistentes que podem estar presentes no esfregaço, prejudicando a interpretação do resultado (GOHAR, 1952). Outras desvantagens são: a necessidade de um sistema de iluminação adequado, o custo do aparelho de microscopia e a exigência de técnicos experientes na interpretação do exame (VON HAEBLER; MURRAY, 1954; OLIVA, 1958).

Alguns autores recomendam a microscopia de fluorescência como método de screening, podendo ser confirmada através do Ziehl-Neelsen (VON HAEBLER; MURRAY, 1954; MANSFIELD, 1970; SOMOSKÖVI et al., 2001).

2.6.3 Microscopia

O exame microscópico deve ser realizado em, no mínimo, 100 campos representativos, em zigzag, iniciando-se na porção superior do esfregaço (BRASIL, 1989b).

O bacilo de Hansen tem tendência a formar agrupamentos peculiares denominados globias, onde são unidos por uma substância incolor, denominada gléia. No entanto, os bacilos podem apresentar-se isolados, quando em número reduzido, ou constituir aglomerados de bacilos (REES, 1985; SAMPAIO; RIVITTI, 2000).

No corpo bacilar, observam-se granulações denominadas de Lutz-Unna. Havendo a desintegração do bacilo, por influência do tratamento ou por seu envelhecimento natural, os grânulos persistem e continuam a ser observados ao microscópio de forma isolada. É denominada “poeira bacilar” (REES, 1985; OPROMOLLA, 2000).

2.6.4 Índice Baciloscópio (IB)

O IB, proposto por Ridley em 1962, representa a escala logarítmica de cada esfregaço examinado, constituindo a média dos índices dos esfregaços (RIDLEY; JOPLING, 1966). Os bacilos observados em cada campo microscópico são contados, e o número de campos examinado é anotado. A média do número de bacilos será o IB do esfregaço. O IB do paciente será a média dos índices dos esfregaços. O resultado é expresso conforme a escala logarítmica de Ridley, variando de 0 a 6+ (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A baciloscopia mostra-se negativa nas formas PB, tuberculóide e indeterminada, fortemente positiva na forma virchowiana e apresenta resultados variáveis na forma dimorfa (REES, 1985; ARAÚJO, 2003).

O resultado do IB está sujeito a numerosas variáveis que dificultam a sua padronização, como profundidade do corte, quantidade de tecido removido, tamanho e espessura do esfregaço (BRASIL, 2001).

2.6.5 Índice Morfológico

A baciloscopia também é utilizada para descrever o aspecto morfológico dos bacilos no esfregaço. Os bacilos sólidos ou íntegros, considerados viáveis, apresentam-se intensa e uniformemente corados. O percentual destes, em relação ao total de bacilos examinados, representa o índice morfológico do esfregaço. O índice morfológico do paciente será a média dos valores encontrados nos esfregaços (REES, 1985). Esse exame tem sido utilizado para fins de pesquisa, caindo em desuso na rotina clínica por sua limitada praticidade.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar as técnicas de Ziehl-Neelsen e fluorescência pela Auramina O na baciloscopia do raspado dérmico em quatro e seis sítios para detecção de *M. leprae* em casos novos de hanseníase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever as características da população estudada.
2. Avaliar a concordância interobservador da baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O.
3. Analisar a concordância da baciloscopia do raspado dérmico entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e entre quatro e seis sítios.
4. Estudar a concordância entre a baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e a classificação operacional.
5. Estudar a associação entre a baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e a classificação de Madrid.
6. Estudar a associação da positividade do exame baciloscópico com as variáveis: sexo, idade, número de lesões cutâneas e número de nervos comprometidos.

PACIENTES E MÉTODOS

4 PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no Ambulatório de Dermatologia do Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais – HEM/FHEMIG. Este serviço é credenciado como Centro de Referência Macro-regional em Hanseníase pelo MS.

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo transversal, descritivo e analítico, comparando os testes de Ziehl-Neelsen e Auramina O na baciloscopia do raspado dérmico de casos novos de hanseníase, entre diferentes observadores, entre quatro e seis sítios, correlacionando as variáveis sexo, idade, número de lesões cutâneas, número de nevus acometidos, classificação de Madrid e classificação operacional.

4.2 PACIENTES

Fizeram parte do estudo 110 casos novos de hanseníase, diagnosticados no Centro de Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes ou referenciados ao mesmo, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007. Os pacientes foram submetidos à coleta do raspado dérmico para realização da baciloscopia, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Apêndice A.

4.2.1 Critérios de Inclusão

- a. Casos novos de hanseníase diagnosticados no Serviço de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes ou referenciados ao mesmo, no período compreendido entre setembro de 2006 e outubro de 2007.
- b. Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Apêndice A.

4.2.2 Critérios de Exclusão

Pacientes com diagnóstico de hanseníase em tratamento.

4.2.3 Critérios de Perda

- a. Lâminas inadequadas para análise: quebradas, danificadas ou má coloração.
- b. Não realização da leitura das lâminas coradas pela técnica da Auramina, pelos dois examinadores, num período de até seis horas após a coloração.

Não houve perdas.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Coleta do Material para Baciloscopia

Os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia do Hospital Eduardo de Menezes para coleta do raspado dérmico para a realização da baciloscopia.

4.3.1.1 Material necessário (BRASIL, 1989b)

- a. Lâmina de vidro (com extremidade fosca)
- b. Lápis preto n.2
- c. Bico de gás
- d. Algodão, gaze, álcool e esparadrapo
- e. Lâmina de bisturi n.15
- f. Pinça Kelly
- g. Luvas de procedimento
- h. Recipiente para armazenamento e transporte de lâminas

4.3.1.2 Sítios de coleta

O raspado dérmico foi realizado, em cada paciente, em seis sítios, para que fosse possível o exame de quatro e seis sítios. Foram coletadas duas amostras de cada sítio, para a coloração pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O. O procedimento foi efetuado de acordo com a ordem de prioridade descrita abaixo, preconizada pelo MS (BRASIL, 1989b, 2002):

- a. Raspado dérmico de lesão ativa ou área com alteração de sensibilidade.
- b. Raspado dérmico dos lóbulos auriculares.
- c. Raspado dérmico do cotovelo contralateral à lesão.
- d. Na ausência de lesões ou áreas com alteração de sensibilidade, os raspados dérmicos foram coletados dos lóbulos auriculares e cotovelos.

Para o exame em seis sítios, foi adicionada a coleta do raspado dérmico dos joelhos. O termo quatro sítios refere-se a: lesão, lóbulos auriculares e cotovelo contralateral à lesão. O termo seis sítios refere-se a: lesão, lóbulos auriculares, cotovelo contralateral à lesão e joelhos.

A Fig. 1 ilustra os esfregaços colhidos por paciente, em quatro lâminas, que foram posteriormente codificadas para análise.

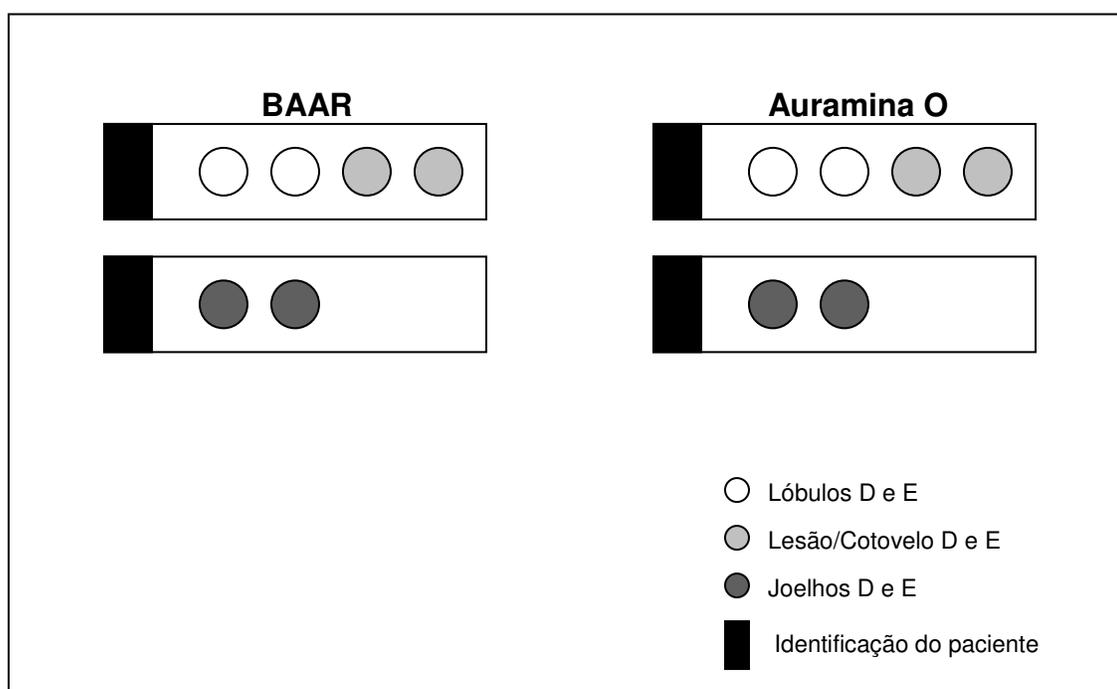


FIGURA 1 - Esquema representativo da coleta de esfregaços para realização da baciloscopia por paciente no Laboratório de Microbiologia do HEM/FHEMIG

4.3.1.3 Técnica de coleta (BRASIL, 1989b)

- 1- Utilização de lâminas novas, limpas e desengorduradas.
- 2- Identificação correta da lâmina, do mesmo lado onde serão colocados os esfregaços.
- 3- Utilização de lâminas de bisturi em boas condições.
- 4- Identificação dos sítios de coleta e limpeza com algodão embebido em álcool a 70%.
- 5- Pregueamento da pele onde o material será colhido, com auxílio da pinça Kelly, com pressão suficiente para provocar isquemia.
- 6- Incisão no local da isquemia, de aproximadamente 5mm de extensão por 3mm de profundidade, utilizando lâmina de bisturi número 15. Em caso de sangramento, enxugar com algodão.
- 7- Raspagem das bordas e do fundo do corte realizado, com o auxílio da face não cortante da lâmina de bisturi, retirando material suficiente para transportar para a lâmina de vidro. Descompressão do local.
- 8- Distribuição do material coletado sobre a lâmina de vidro, identificada previamente, homogeneizando com movimentos circulares, em uma área de aproximadamente 5 a 7mm de diâmetro. O esfregaço não deve conter sangue, pois sua presença pode acarretar resultados errôneos.
- 9- Cobertura da lesão com curativo compressivo.
- 10- O primeiro esfregaço deverá ser colocado na extremidade da lâmina, próxima à sua identificação; os demais seguirão a ordem de coleta. Deve-se obedecer à mesma disposição em todos os pacientes.
- 11- Utiliza-se uma lâmina de bisturi para cada sítio de coleta, obedecendo-se às normas de biossegurança e evitando-se transferir bacilos para esfregaços de outros sítios.

4.3.2 Fixação

Os esfregaços foram deixados à temperatura ambiente para secar durante 10 a 20 minutos. Posteriormente, a lâmina foi passada rapidamente (duas a três vezes) na chama de um bico de gás, mantendo a face, onde foram colocados os esfregaços, voltada para cima (BRASIL, 1989b).

4.3.3 Coloração

Os esfregaços foram corados pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e da Auramina O.

4.3.3.1 Técnica de Ziehl-Neelsen

Os esfregaços foram corados pelo método de Ziehl-Neelsen e sua leitura feita pelo técnico responsável do Hospital Eduardo de Menezes. Ambos os processos de coloração – por calor ou a frio – podem ser utilizados, por apresentar resultados satisfatórios (BRASIL, 1989b). Optou-se, neste estudo, pela utilização do método de coloração a frio, que tem a vantagem de não danificar o esfregaço por excesso de calor, descrito no manual de *Normas Técnicas e Procedimentos para o Exame Baciloscópico em Hanseníase* e detalhado no Apêndice C (BRASIL, 1989b). Em seguida, as lâminas foram armazenadas em local apropriado – estojo de lâminas livre de umidade, poeira, luz e calor – e enviadas ao Laboratório Micra Biotecnologia para uma segunda leitura.

4.3.3.2 Técnica da Auramina O

Após a fixação dos esfregaços, as lâminas foram armazenadas em local apropriado – estojo de lâminas livre de umidade, poeira, luz e calor – e enviadas ao laboratório Micra Biotecnologia, onde foram coradas pelo método fluorescente e analisadas por dois técnicos, que não tiveram contato entre si. A técnica de coloração utilizada foi aquela descrita por Richards e Miller (1941), detalhada no Apêndice D. Estabeleceu-se o período máximo de seis horas entre uma leitura e outra.

4.3.4 Microscopia

As lâminas com quatro e dois sítios foram codificadas e analisadas separadamente.

Os esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen foram examinados através do microscópio óptico Nikon Alphaphot II, com ocular de 10X e objetiva de

imersão de 100X, colocando-se uma gota de óleo mineral sobre os mesmos. A leitura foi realizada em 100 campos microscópicos.

A aparelhagem empregada para análise da coloração fluorescente foi um microscópio Olympus, modelo CBA, binocular, com objetivas acromáticas de 10X, 40X e 100X, diafragma íris, oculares de grande campo, condensador cardióide de campo escuro e sistema de iluminação duplo com lâmpadas halógenas de baixa tensão de 20W e de 100W. O sistema de filtros consistiu em filtro excitador IF490 e filtros de absorção amarelos O530 e H21102T com intermediário de 1,2X. Iniciou-se a leitura dos esfregaços com menor aumento (10X e a seguir 40X) e, quando detectada a presença de bacilos, selecionou-se a objetiva de imersão (100X) para o cálculo do IB. A leitura foi realizada em 100 campos microscópicos.

Os bacilos foram contados em cada campo microscópico, incluindo aqueles isolados, agrupados e as globias. Os bacilos de uma globia não podem ser contados, porém o número pode ser estimado. Uma globia pequena contém cerca de 30 bacilos, uma de tamanho médio, em torno de 60 bacilos, e uma globia grande, aproximadamente 100 bacilos (BRASIL, 1989a).

A leitura foi feita separadamente por sítio anatômico. Os bacilos em cada campo microscópico foram contados e o número anotado. Após o término da análise do esfregaço de cada sítio, os valores foram somados, dividindo-se pelo número de campos examinados (100). Essa média do número de bacilos é o IB do esfregaço. O IB do paciente é a média dos índices dos quatro esfregaços, no exame de quatro sítios, e a média dos resultados dos seis esfregaços naquele de seis sítios. O resultado foi expresso de acordo com a escala logarítmica de Ridley, abaixo representada (RIDLEY; JOPLING, 1966):

IB = 0: não há bacilos em nenhum dos 100 campos examinados

IB = (1+): um a 10 bacilos, em 100 campos examinados

IB = (2+): um a 10 bacilos, em 10 campos examinados (11-99 bacilos em 100 campos)

IB = (3+): 10 bacilos, em média, em cada campo examinado

IB = (4+): 100 bacilos, em média, em cada campo examinado

IB = (5+): 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado

IB = (6+): mais de 1000 bacilos, em média, em cada campo examinado

A leitura foi realizada por dois observadores independentes para cada técnica, que atuaram em momentos diferentes. Além disso, as lâminas contendo quatro sítios e as correspondentes com dois sítios foram identificadas com diferentes códigos.

4.3.5 Classificação

Para este estudo foram considerados os critérios de classificação de Madrid e a classificação operacional adotada pelo MS.

Para a classificação de Madrid, foram consideradas as formas clínicas indeterminada, tuberculóide, dimorfa e virchowiana.

O critério para a classificação operacional baseou-se no número de lesões de pele, como publicado em 2002 no *Guia para o Controle da Hanseníase*. Assim, foram considerados PB, os pacientes que apresentavam até cinco lesões cutâneas e MB, aqueles com mais de cinco lesões (BRASIL, 2002).

4.4 VARIÁVEIS ESTUDADAS

Variáveis epidemiológicas:

- idade;
- sexo;

Variáveis clínicas:

- número de lesões de pele;
- número de nervos comprometidos;
- classificação operacional;
- classificação de Madrid.

Variáveis laboratoriais:

- baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen;
- baciloscopia pelo método da Auramina O;
- baciloscopia em quatro sítios;
- baciloscopia em seis sítios;

4.5 COLETA E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram coletados através do preenchimento da ficha do paciente - Apêndice B. As informações obtidas foram armazenadas em banco de dados computadorizado, utilizando-se o *software* Epi Data 3.1 [Lauristen JM (editor) *Epi Data Entry, Data Management and basic Statistical Analysis Sistem*, Epi Data Association, 2000-2006 (Disponível em: <http://www.epidata.dk>)].

Para as análises estatísticas, adotou-se o software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 12.0 for windows - SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América, 2005.

4.5.1 Análise Descritiva e Exploratória

A análise descritiva e exploratória dos dados teve como objetivo obter maior conhecimento das variáveis envolvidas no estudo e verificar sua relação com as variáveis de maior interesse, ou seja, as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O. As variáveis quantitativas contínuas foram expressas através de medidas de tendência central (média e mediana) e variabilidade (desvio-padrão), enquanto as variáveis categóricas foram expostas em percentagem ou sob a forma descritiva.

4.5.2 Estudos de Concordância

4.5.2.1 Coeficiente Kappa

Foram realizados estudos de concordância da baciloscopia entre examinadores diferentes e, posteriormente, entre os métodos de Ziehl-Neelsen e Auramina O e entre quatro e seis sítios. Foi também analisada a concordância entre exame baciloscópico e classificação operacional. Utilizou-se o Coeficiente Kappa para avaliar a concordância entre medidas categóricas. O método é utilizado na avaliação quantitativa da confiabilidade entre técnicas de medidas discretas, que leva em consideração a concordância devida ao acaso, com valor de p menor que 0,05 como nível crítico de significância.

O Kappa avalia o grau de concordância além do que seria esperado tão somente pelo acaso. Nesse índice, o valor 1,0 representa total concordância e os valores próximos e até abaixo de zero indicam nenhuma concordância, ou esta foi exatamente a esperada pelo acaso (JAESCHKE et al., 1994; LANDIS; KOCH, 1977). A interpretação é feita através dos critérios de Landis & Koch (1977), como mostrado na tabela 5.

TABELA 5
Interpretação do Grau de Concordância de acordo com o Coeficiente Kappa

Kappa	Grau de concordância
< 0,00	POBRE
0,00 – 0,20	MUITO LEVE
0,21 – 0,40	LEVE
0,41 – 0,60	MODERADO
0,61 – 0,80	SUBSTANCIAL
0,81 – 1,00	QUASE PERFEITO ou EXCELENTE

Fonte: Landis & Koch, 1977.

4.5.2.2 Coeficiente de Correlação Intraclasse

Para analisar a confiabilidade das medidas intervalares descritas neste estudo, foi utilizado o Coeficiente de Correlação Intraclasse (*Intraclass Correlation Coefficient* – ICC). Este mostra o grau de concordância existente entre medições oriundas de processos independentes, usualmente provenientes de diferentes examinadores ou processos de mensuração. Empregou-se ICC modelo (2,1), em que se supõe que os examinadores ou processos de medição são uma amostra aleatória de uma população de medições/examinadores (SHROUT; FLEISS, 1979). A premissa é que os dois observadores fazem parte de uma população de observadores elegíveis. Do mesmo modo, pressupõe-se que os valores obtidos para as medidas em quatro e seis sítios são um subconjunto de todas as medições possíveis (com dois, três ou mais sítios). Portanto, aplica-se o mesmo modelo a todos os tipos de confiabilidade.

Os valores de ICC variam de zero a 1,0 e, quanto mais próximo deste estiver o resultado, mais confiável é a medição. A tabela 6 mostra a interpretação dos valores, conforme Shrout e Fleiss (1979).

Inicialmente, calculou-se a confiabilidade entre examinadores, pois o objetivo era agrupar medidas similares, para em seqüência verificar a confiabilidade entre os exames, considerando os processos de quatro e seis sítios e os métodos de coloração.

TABELA 6
Interpretação do Coeficiente de Correlação Intraclasse

ICC	Grau de confiabilidade
< 0,40	BAIXA
0,40 – 0,75	SATISFATÓRIA
> 0,75	EXCELENTE

Fonte: Shrout e Fleiss, 1979.

4.5.3 Teste de McNemar

Utilizou-se o teste de McNemar com o objetivo de verificar se a discordância entre os métodos de coloração e os diferentes sítios é significativa. Este teste indica se há ou não pares discordantes em excesso, para alguma das variáveis. Na prática, sua interpretação é inversa ao Índice de Kappa; quanto maior o valor do Kappa, menor o valor do McNemar, indicando que os pares discordantes não são significativos, especialmente se a proporção de casos discordantes for similar para os dois exames (SOARES; SIQUEIRA, 2002).

4.5.4 Teste *t* para amostras emparelhadas

Testes *t* foram aplicados para verificar se existem diferenças entre as médias de duas variáveis intervalares (MENZ et al., 2004). Apresenta a vantagem de reduzir a variância quando duas variáveis estão correlacionadas.

Este teste foi utilizado na análise entre os diferentes examinadores, os métodos de coloração e os sítios estudados.

4.5.5 Correlação de Spearman

O coeficiente de correlação de postos de Spearman foi utilizado para avaliar a correlação entre os métodos de Ziehl-Neelsen e Auramina O, nos diferentes sítios examinados. É adequado para variáveis de nível ordinal ou quando não se observa o pressuposto de normalidade (PESTANA; GAGEIRO, 2000). O coeficiente varia entre -1,0 e 1,0, indicando o aumento médio na ordem padronizada de uma variável quando se observa aumento de uma unidade na ordem da segunda variável.

4.5.6 Teste Qui Quadrado

O teste qui quadrado foi empregado para avaliar a existência de associação entre duas variáveis qualitativas - Classificação de Madrid e exame baciloscópico categorizado como negativo e positivo. A hipótese nula verificada pelo teste foi a de que não existe associação entre as duas variáveis (SOARES; SIQUEIRA, 2002). A estatística de teste é verificada na tabela de distribuição qui quadrado. Um valor significativo, inferior a 0,05, indica associação entre as variáveis.

4.5.7 Curva ROC

A análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*) é uma ferramenta que utiliza o método gráfico e permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade de uma variável ou teste para diferentes valores de corte. A área abaixo da curva ROC está associada ao poder discriminante do teste.

A curva ROC é traçada com o percentual de casos positivos (sensibilidade) no eixo Y, e o percentual de casos negativos (1-especificidade: taxa de falsos negativos) no eixo X. Cada ponto da curva representa a interseção das duas medidas. Curvas construídas para métodos de classificação que tenham uma discriminação ótima situam-se no canto superior esquerdo do gráfico (100% de sensibilidade e 100% de especificidade em algum ponto de corte). Deste modo, quanto mais próximo dessa área, maior é a capacidade de classificação do teste (ZWEIG; CAMPBELL, 1993) e, quanto mais a curva se aproxima da linha de referência diagonal, menor é a precisão do mesmo.

4.5.8 Regressão logística

O modelo de regressão logística é sugerido quando se deseja explicar uma variável dependente binária (resultado dicotômico) usando um conjunto de variáveis independentes (explicativas) que podem contribuir para a sua explicação.

4.5.8.1 Análise Bivariada

Análise bivariada foi realizada para avaliar a associação da baciloscopia com as outras variáveis do estudo, considerando o resultado negativo e positivo. Através dessa análise, realizou-se triagem das variáveis para a criação do modelo multivariado mais adequado.

Em estudos de regressão logística, Mickey e Greenland (1989) sugerem usar nível de significância de 0,25, devido ao fato de que os níveis usuais (por exemplo, 0,05) freqüentemente não conseguem identificar variáveis importantes.

4.5.8.2 Análise Multivariada

O modelo logístico multivariado analisa a associação entre variáveis através da razão de chances. Esta medida indica a chance proporcional de ocorrer um resultado positivo para um paciente, quando comparamos com a categoria de base (OR=1). O efeito das variáveis é levado em conta de maneira simultânea, assim a inserção de outra variável pode alterar o valor do coeficiente. Isso explica a diferença dos resultados obtidos por tabelas de dupla entrada (bivariadas) daqueles obtidos no modelo multivariado. Utilizou-se a metodologia de regressão logística binária, com o objetivo de estudar a associação entre a variável binária exame baciloscópico e covariáveis de natureza categórica ou contínua.

O teste de Wald foi usado para verificar se o efeito de determinada covariável foi significativo no ajuste do modelo de regressão logística (HOSMER; LEMESHOW, 1989). O Teste de Hosmer & Lemeshow (1989) foi utilizado para verificar se o modelo ajustado era adequado, ou seja, se o modelo encontrado ajustava-se bem aos dados. A hipótese nula era a de que o modelo era adequado; assim, uma probabilidade de significância maior que o nível especificado pelo estudo (0,05) indicaria que o modelo era ajustado aos dados. A medida de R^2 de

Nagelkerke mostrou a precisão do modelo. Finalmente, empregou-se a concordância entre os resultados do exame e os previstos do modelo, para identificar sua capacidade preditiva.

4.6 CÁLCULO DO PODER DO TESTE

Foram aplicados cálculos de poder do teste para aqueles utilizados no estudo, a fim de verificar se a amostra obtida apresenta tamanho que permita chance razoável de rejeitar as hipóteses nulas (SOARES; SIQUEIRA, 2002). Para os testes *t*, encontrou-se que a amostra garantiria o menor poder (47%) na análise da diferença entre as variáveis Ziehl-Neelsen quatro sítios e Auramina quatro sítios. Dado que os resultados levaram à conclusão de rejeição da hipótese nula, pode-se dizer que tal situação não é prejudicial. Deste modo, os testes *t* apresentam resultados adequados para o tamanho da amostra. Quanto aos testes de Kappa e qui quadrado, obteve-se poder da ordem de 92%, demonstrando elevada capacidade de detectar concordância caso ela seja verdadeira. Para os modelos logísticos, o poder encontrado foi de aproximadamente 100%, bem como para as medidas de correlação e para o ICC. Pode-se concluir que a amostra deste estudo é adequada para o teste de hipóteses avaliado.

4.7 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

O levantamento bibliográfico foi realizado nas bases de dados da BVS (Biblioteca Virtual em Saúde) - Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), acervo da Biblioteca da OMS e Biblioteca do MS. Utilizou-se também o Medline interface PubMed. Os termos pesquisados na Lilacs foram selecionados nos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da BVS: hanseníase, *Mycobacterium leprae*, coloração e microscopia de fluorescência. No Medline, foram utilizados os descritores do Mesh (Medical Subject Headings): leprosy, *Mycobacterium leprae*, staining e fluorescence microscopy. Os termos skin smear, Ziehl-Neelsen e Auramine foram pesquisados nos campos de *title e abstract*. Filtros utilizados foram publicações nos idiomas português, espanhol, inglês e francês. Foram realizadas também pesquisas em bibliotecas universitárias e selecionados artigos de periódicos, teses e dissertações.

As citações no texto foram indicadas pelo sistema autor-data e as referências foram organizadas, no final do trabalho, em ordem alfabética, de acordo com as normas preconizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

4.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi submetido, inicialmente, à apreciação e aprovação do colegiado da Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Infectologia e Medicina Tropical e da Câmara do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG. Em seguida, foi enviado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes da FHEMIG e Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Os Anexos A e B mostram os relatórios de aprovação desses comitês.

O pacientes e/ou responsáveis foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa mediante leitura do termo de consentimento e esclarecimento de dúvidas. Os participantes só foram incluídos no estudo mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). Os dados obtidos foram utilizados exclusivamente para os fins da pesquisa e a identidade dos pacientes foi mantida em total sigilo.

Este estudo trouxe pequeno risco aos participantes, uma vez que foram submetidos à coleta de dois sítios além do preconizado, para os testes laboratoriais comparativos entre o número de sítios. Não houve registro de complicações decorrentes da coleta.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A análise descritiva dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes no período de setembro de 2006 a outubro de 2007 é apresentada na tabela 7.

A idade variou de 10 a 79 anos, com média de 46,5 anos (desvio-padrão: 15,1), sendo que 69 pacientes (62,7%) apresentaram idade entre 20 e 50 anos. Os pacientes apresentaram, em média, 5,6 lesões cutâneas (desvio-padrão: 5,0) e 1,3 nervos comprometidos (desvio-padrão: 1,7), sendo que os valores mínimos e máximos observados foram, respectivamente, 0 e 24 para o número de lesões e 0 e 7 para o número de nervos.

TABELA 7
Distribuição dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no Hospital Eduardo de Menezes no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Variável	n	%
Sexo		
Masculino	65	59,1
Feminino	45	40,9
Idade		
< 15 anos	02	1,8
15 – 30 anos	17	15,5
31 – 45 anos	28	25,4
46 – 60 anos	45	40,9
> 60 anos	18	16,4
Número de lesões cutâneas		
≤ 5 lesões	59	53,6
> 5 lesões	51	46,4
Número de nervos acometidos		
≤ 1 nervo	67	60,9
> 1 nervo	43	39,1
Classificação Operacional OMS		
Paucibacilar	59	53,6
Multibacilar	51	46,4
Classificação de Madrid		
Indeterminada	06	5,4
Tuberculóide	11	10,0
Dimorfa	76	69,1
Virchowiana	17	15,5

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: n: número de casos; %: percentagem.

5.2 ESTUDO DA CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR

Inicialmente, calculou-se a confiabilidade entre dois examinadores independentes, pois o objetivo era agrupar medidas similares de cada examinador, para em seqüência verificar a confiabilidade entre os métodos, considerando as técnicas utilizadas e número de sítios examinados.

5.2.1 Aplicabilidade clínica da baciloscopia

Considerando a aplicabilidade prática do exame, ou seja, se é negativo ou positivo, utilizou-se o Índice de Kappa para avaliar a concordância e os critérios de Landis & Koch (1977) para a interpretação desse índice. Os resultados encontram-se nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

TABELA 8
Concordância interobservador da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen em quatro sítios dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

		Ziehl-Neelsen - 4 sítios		
		Examinador 1		Total N
Examinador 2		Negativo n	Positivo n	
	Negativo	71	03	74
	Positivo	02	34	36
Total	73	37	110	

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: n: número de casos. Índice de Kappa = 0,90 - IC a 95%: 0,81 a 0,98 (p < 0,001)

TABELA 9
Concordância interobservador da baciloscopia pelo método de Ziehl-Neelsen em seis sítios dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

		Ziehl-Neelsen - 6 sítios		
		Examinador 1		Total N
Examinador 2		Negativo n	Positivo n	
	Negativo	69	04	73
	Positivo	02	35	37
Total	71	39	110	

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: n: número de casos. Índice de Kappa = 0,88 - IC a 95%: 0,79 a 0,97 (p < 0,001)

TABELA 10
Concordância interobservador da baciloscopia pelo método da Auramina em quatro sítios dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Auramina - 4 sítios				
		Examinador 1		Total N
		Negativo n	Positivo n	
Examinador 2	Negativo	71	01	72
	Positivo	0	38	38
	Total	71	39	110

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: n: número de casos. Índice de Kappa = 0,98 - IC a 95%: 0,94 a 1,0 (p < 0,001)

TABELA 11
Concordância interobservador da baciloscopia pelo método da Auramina em seis sítios dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Auramina - 6 sítios				
		Examinador 1		Total N
		Negativo n	Positivo n	
Examinador 2	Negativo	69	01	70
	Positivo	01	39	40
	Total	70	40	110

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: n: número de casos. Índice de Kappa = 0,96 - IC a 95%: 0,91 a 1,0 (p < 0,001)

5.2.2 Aspectos laboratoriais

Como o resultado da baciloscopia é expresso através de medidas intervalares – índice baciloscópico – empregou-se o Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) para avaliar sua confiabilidade. A tabela 12 mostra os resultados da concordância dos métodos de coloração entre os dois examinadores, tanto em quatro como em seis sítios.

TABELA 12

Confiabilidade interobservador dos métodos de coloração (Ziehl-Neelsen e Auramina) na baciloscopia de quatro e seis sítios dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Medidas	n	Média	Desvio	Confiabilidade	
				ICC (2,1)	IC (95%)
Ziehl4 e1	110	0,95	1,53	0,97	(0,96; 0,98)
Ziehl4 e2	110	0,84	1,41		
Ziehl6 e1	110	0,84	1,36	0,98	(0,97; 0,99)
Ziehl6 e2	110	0,76	1,30		
Aura4 e1	110	0,93	1,48	0,99	(0,98; 0,99)
Aura4 e2	110	0,96	1,53		
Aura6 e1	110	0,85	1,38	0,99	(0,99; 1,0)
Aura6 e2	110	0,87	1,43		

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Ziehl4: Ziehl-Neelsen em quatro sítios; Ziehl6: Ziehl-Neelsen em seis sítios; Aura4: Auramina em quatro sítios; Aura 6: Auramina em seis sítios; e1: examinador 1; e2: examinador 2; n: número de pacientes; média: média aritmética de cada variável; desvio: desvio padrão das medições. IC (95%): intervalo de confiança (95%) do ICC.

Testes *t* foram realizados para amostras emparelhadas, a fim de verificar se há diferenças entre os escores dos examinadores, considerando cada conjunto mensurado. Os resultados são apresentados na tabela 13.

TABELA 13

Comparação entre os observadores dos resultados da baciloscopia pelos métodos de Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro e seis sítios através de testes *t*, dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Medida	Dif	Desvio	Erro	IC (95%)	T	p-valor
Ziehl4 e1 - Ziehl4 e2	0,109	0,451	0,043	(0,024; 0,194)	2,536	0,013
Ziehl6 e1 - Ziehl6 e2	0,077	0,375	0,036	(0,006; 0,148)	2,148	0,034
Aura4 e1 - Aura4 e2	-0,030	0,306	0,029	(-0,087; 0,028)	-1,012	0,314
Aura6 e1 - Aura6 e2	-0,023	0,225	0,021	(-0,065; 0,020)	-1,057	0,293

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Ziehl4: Ziehl-Neelsen em quatro sítios; Ziehl6: Ziehl-Neelsen em seis sítios; Aura4: Auramina em quatro sítios; Aura 6: Auramina em seis sítios; e1: examinador 1; e2: examinador 2; medida: variável em que foi tomada a diferença; Dif: diferença entre medidas; Desvio: desvio padrão da diferença; Erro: erro padrão da diferença; IC (95%): intervalo de confiança (95%); T: valor *t* de teste; p: significância do teste *t*.

A tabela 14 apresenta os casos discordantes entre os examinadores.

TABELA 14
Características dos casos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007, cujo resultado do índice baciloscópico foi discordante entre os dois examinadores pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O em quatro e seis sítios

Paciente	Sexo	Idade	Nº Lesões	OMS	Madrid	Ziehl-Neelsen		Auramina	
						4 sítios e1 / e2	6 sítios e1 / e2	4 sítios e1 / e2	6 sítios e1 / e2
1	M	29	08	MB	D	1,5/0	1,5/0,5	0,3/0,3	0,7/0,7
2	M	38	12	MB	D	0/0,8	0/0,5	1/1,3	0,7/0,8
3	M	76	05	PB	D	0/0	0,7/0	0,3/0,5	0,2/0,3
4	M	62	10	MB	D	0,8/0	0,5/0	0/0	0/0
5	M	54	06	MB	D	0/0	0/0	0/0	0/0,2
6	M	35	05	PB	D	0/0,3	0/0,2	0,3/0	0,2/0
7	F	23	06	MB	D	0/0	0,3/0	0/0	0/0
8	F	38	07	MB	D	0,3/0	0,2/0	0/0	0/0

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: M: masculino; F: feminino; MB: multibacilar; PB: paucibacilar; D: dimorfa; e1: examinador 1; e2: examinador 2.

5.3 ANÁLISE ENTRE OS MÉTODOS DE COLORAÇÃO E ENTRE OS SÍTIOS

5.3.1 Correlação entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O

A relação existente entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O é mostrada através de diagrama de dispersão, visualizado no gráfico da Fig. 2 e Fig. 3, que correspondem à análise em quatro e seis sítios, respectivamente. As medidas correlacionadas correspondem às médias dos IB das avaliações dos dois observadores, buscando reduzir flutuações aleatórias nas medições (reduzindo o erro de medição).

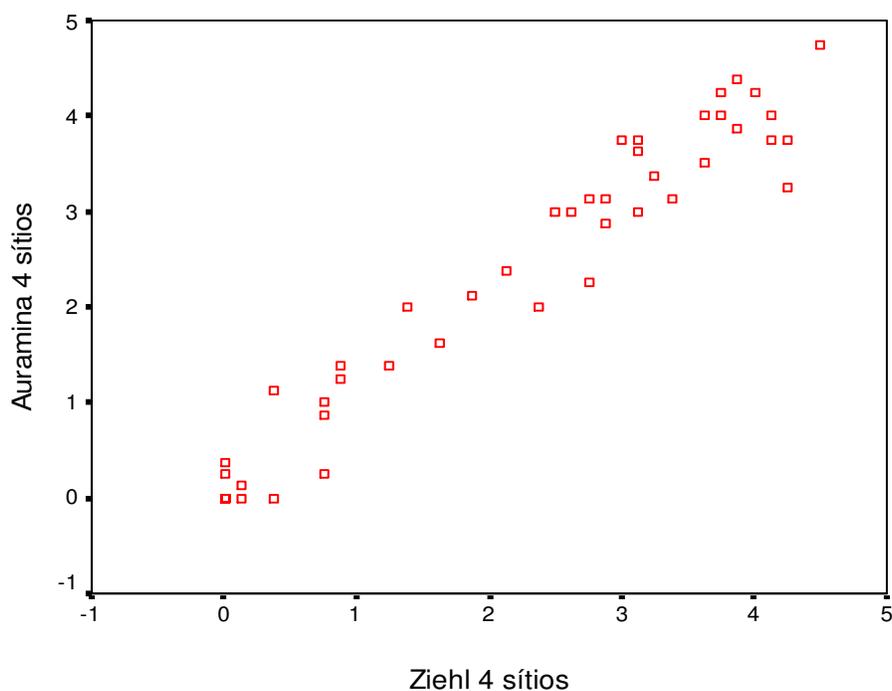


FIGURA 2 – Gráfico com a correlação das médias dos IB dos observadores entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O em quatro sítios, dos 110 casos novos de Hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Spearman = 0,961 ($p < 0,001$)

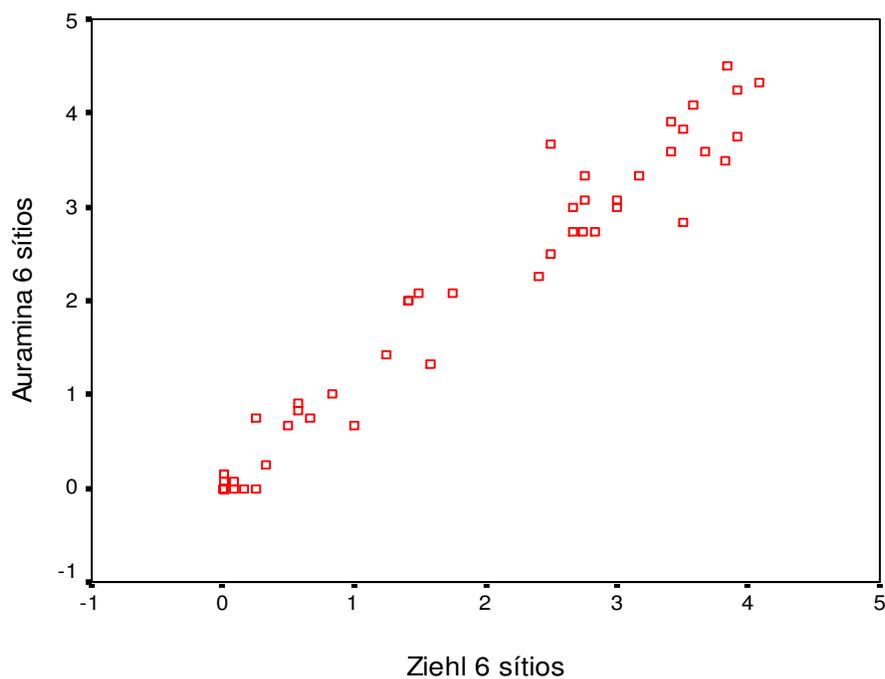


FIGURA 3 – Gráfico com a correlação das médias dos IB dos observadores entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O em seis sítios, dos 110 casos novos de Hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007.

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Spearman = 0,948 ($p < 0,001$)

5.3.2 Concordância entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e entre os sítios

5.3.2.1 Aplicabilidade clínica da baciloscopia

Considerando a aplicabilidade da baciloscopia, o resultado é considerado positivo ou negativo, de acordo com a presença ou não de bacilos nos esfregaços. Assim, foram classificados como positivos os exames em que a média dos valores obtidos pelos dois examinadores foi diferente de zero e negativos aqueles com média igual a zero. O estudo da concordância entre os testes foi realizado através do Índice de Kappa e as diferenças entre os mesmos foram analisadas através do teste de McNemar. As tabelas 15, 16, 17 e 18 mostram os resultados obtidos.

TABELA 15

Concordância da baciloscopia entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro sítios, dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

		Ziehl-Neelsen (4 sítios)		Total n
		Negativo n	Positivo n	
Auramina	Negativo	69	02	71
	Positivo	02	37	39
	Total	71	39	110

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: Índice de Kappa = 0,92 - IC a 95%: 0,84 a 1,00. McNemar (p = 1,00).

TABELA 16

Concordância da baciloscopia entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina em seis sítios, dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

		Ziehl-Neelsen (6 sítios)		Total n
		Negativo n	Positivo n	
Auramina	Negativo	66	03	69
	Positivo	03	38	41
	Total	69	41	110

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: Índice de Kappa = 0,88 - IC a 95%: 0,79 a 0,97. McNemar (p = 1,00).

TABELA 17
Concordância da baciloscopia entre quatro e seis sítios pelo método de Ziehl-Neelsen dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

		4 sítios		Total n
		Negativo n	Positivo n	
6 sítios	Negativo	69	0	69
	Positivo	02	39	41
	Total	71	39	110

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: Índice de Kappa = 0,96 - IC a 95%: 0,91 a 1,00. McNemar (p = 0,50).

TABELA 18
Concordância da baciloscopia entre quatro e seis sítios pelo método da Auramina dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

		4 sítios		Total n
		Negativo n	Positivo n	
6 sítios	Negativo	69	0	69
	Positivo	02	39	41
	Total	71	39	110

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: Índice de Kappa = 0,96 - IC a 95%: 0,91 a 1,00. McNemar (p = 0,50).

5.3.2.2 Aspectos laboratoriais

Considerando que os observadores produziram resultados coerentes, as medidas de ambos foram reduzidas a medidas globais aplicando-se a média aritmética de suas pontuações, tal como explicitam Shrout e Fleiss (1979) em procedimentos de redução das medições a grupos mais confiáveis. Assim, o estudo passa a ter quatro medições: Ziehl-Neelsen em quatro sítios, Ziehl-Neelsen em seis sítios, Auramina em quatro sítios e Auramina em seis sítios.

Utilizou-se a medida do ICC para avaliar a concordância entre as técnicas de coloração e entre o número de sítios, mostrada na tabela 19. Posteriormente, utilizou-se o teste *t* para verificar se há diferença entre as médias dos grupos, cujo resultado se encontra na tabela 20.

TABELA 19
 Confiabilidade entre os métodos de coloração e entre o número de sítios dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Medidas	n	Média	Desvio	Confiabilidade	
				ICC (2,1)	IC (95%)
Ziehl 4	110	0,90	1,45	0,99	(0,99; 0,99)
Aura 4	110	0,94	1,50		
Ziehl 6	110	0,80	1,31	0,99	(0,99; 0,99)
Aura 6	110	0,86	1,40		
Ziehl 4	110	0,90	1,45	0,99	(0,98; 0,99)
Ziehl 6	110	0,80	1,31		
Aura 4	110	0,94	1,50	0,99	(0,99; 1,00)
Aura 6	110	0,86	1,40		

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Ziehl 4: Ziehl-Neelsen em quatro sítios; Ziehl 6: Ziehl-Neelsen em seis sítios; Aura 4: Auramina em quatro sítios; Aura 6: Auramina em seis sítios; média: média aritmética de cada variável. Desvio: desvio padrão das medições. IC (95%): intervalo de confiança (95%) do ICC.

TABELA 20
 Comparação dos resultados entre os métodos de coloração e entre o número de sítios através de testes *t* dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Medida	Dif	Desvio	Erro	IC (95%)	T	p-valor
Ziehl 4 – Aura 4	-0,047	0,244	0,023	(-0,093; -0,001)	-2,007	0,047
Ziehl 6 – Aura 6	-0,063	0,222	0,021	(-0,021; -0,105)	-2,991	0,003
Ziehl 4 – Ziehl 6	0,100	0,225	0,021	(0,057; 0,142)	4,636	0,000
Aura 4 – Aura 6	0,083	0,210	0,020	(0,043; 0,122)	4,135	0,000

Fonte: Dados da pesquisa. Nota: Ziehl 4: Ziehl-Neelsen em quatro sítios; Ziehl 6: Ziehl-Neelsen em seis sítios; Aura 4: Auramina em quatro sítios; Aura 6: Auramina em seis sítios; medida: é a variável em que foi tomada a diferença; Dif: diferença entre medidas; Desvio: desvio padrão da diferença; Erro: erro padrão da diferença; IC (95%): intervalo de confiança (95%); T: valor *t* de teste; p: significância do teste *t*.

Considerando a técnica padronizada pelo MS para a baciloscopia, Ziehl-Neelsen em quatro sítios, a média do IB em cada sítio analisado foi de 2,69 nos lóbulos auriculares (desvio-padrão: 1,59), 2,57 nos cotovelos (desvio-padrão: 1,40) e 1,70 nos joelhos (desvio-padrão: 1,41). A análise comparativa das médias de cada sítio mostrou significância (p-valor) de 0,63 entre lóbulos e cotovelos, 0,000006 entre lóbulos e joelhos e 0,000029 entre cotovelos e joelhos.

5.4 CONCORDÂNCIA ENTRE BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL

Os resultados da análise de concordância entre o exame baciloscópico e a classificação operacional, através do Índice de Kappa, encontram-se nas tabelas 21 e 22.

TABELA 21
Concordância entre a baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro e seis sítios e a classificação operacional dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

C.O.	n	Ziehl-Neelsen				Auramina			
		4 sítios		6 sítios		4 sítios		6 sítios	
		Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
PB	59	54 (92%)	05 (8%)	53 (90%)	06 (10%)	52 (88%)	07 (12%)	51 (86%)	08 (14%)
MB	51	17 (33%)	34 (67%)	16 (31%)	35 (69%)	19 (37%)	32 (63%)	18 (35%)	33 (65%)
Total	110	71 (65%)	39 (35%)	69 (63%)	41 (37%)	71 (65%)	39 (35%)	69 (63%)	41 (37%)

Fonte: Dados da pesquisa

Nota: C.O.: classificação operacional; PB: paucibacilar; MB: multibacilar; neg.: negativo; pos.: positivo

TABELA 22
Medidas de concordância da baciloscopia entre os métodos de coloração (Ziehl-Neelsen e Auramina) e a classificação operacional dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Técnicas	Kappa	IC (95%)
Ziehl-Neelsen	4 sítios	0,59 (0,44; 0,74)
	6 sítios	0,59 (0,44; 0,74)
Auramina	4 sítios	0,52 (0,36; 0,68)
	6 sítios	0,52 (0,36; 0,68)

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: IC (95%): intervalo de confiança (95%).

5.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO DE MADRID

A tabela 23 apresenta os resultados da baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O, tanto em quatro como em seis sítios, de acordo com a classificação de Madrid.

TABELA 23
Associação entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro e seis sítios e a Classificação de Madrid dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Madrid	n	Ziehl-Neelsen				Auramina			
		4 sítios		6 sítios		4 sítios		6 sítios	
		Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.
I	06	06 (100%)	0 (0%)	06 (100%)	0 (0%)	06 (100%)	0 (0%)	05 (83%)	01 (17%)
T	11	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)	11 (100%)	0 (0%)
D	76	54 (71%)	22 (29%)	52 (68%)	24 (32%)	54 (71%)	22 (29%)	53 (70%)	23 (30%)
V	17	0 (0%)	17 (100%)	0 (0%)	17 (100%)	0 (0%)	17 (100%)	0 (0%)	17 (100%)
Total	110	71 (65%)	39 (35%)	69 (63%)	41 (37%)	71 (65%)	39 (35%)	69 (63%)	41 (37%)

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: n: número de casos.

Utilizou-se o teste qui quadrado para avaliar a existência de associação entre cada variável – Ziehl-Neelsen quatro e seis sítios, e Auramina quatro e seis sítios – e a classificação de Madrid, cujo resultado mostrou probabilidade de significância p-valor < 0,001.

5.6 FATORES ASSOCIADOS COM A POSITIVIDADE DA BACILOSCOPIA

5.6.1 Análise Bivariada

Partindo-se da boa concordância obtida entre os diferentes métodos de coloração e entre o número de sítios e, considerando o procedimento preconizado pelo MS em relação ao exame baciloscópico, realizou-se análise qualitativa de associação entre a baciloscopia e as covariáveis do estudo, considerando como padrão a técnica de Ziehl-Neelsen no raspado dérmico de quatro sítios (BRASIL, 2002). O resultado encontra-se na tabela 24.

TABELA 24

Associação entre o resultado do teste de Ziehl-Neelsen em quatro sítios e as covariáveis do estudo na análise bivariada dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Covariáveis	Ziehl-Neelsen		OR	IC (95%)	p-valor
	Negativo	Positivo			
n (%)					
Sexo					
Feminino	35 (49%)	10 (26%)	1,0		
Masculino	36 (51%)	29 (74%)	2,82	(1,20; 6,64)	0,018
Idade					
< 15 anos	02 (3%)	0 (0%)	N.C.	N.C.	N.C.
15 – 30 anos	09 (13%)	08 (11%)	4,44	(0,93; 21,22)	0,061
31 – 45 anos	15 (21%)	13 (18%)	4,33	(1,02; 18,38)	0,047
46 – 60 anos	30 (42%)	15 (21%)	2,50	(0,63; 10,0)	0,195
> 60anos	15 (21%)	03 (4%)	1,0		
Número de lesões					
≤ 5 lesões	54 (76%)	05 (13%)	1,0		
> 5 lesões	17 (24%)	34 (87%)	21,60	(7,30; 63,96)	0,000
Número de nervos					
≤ 1 nervo	51 (72%)	16 (41%)	1,0		
> 1 nervo	20 (28%)	23 (59%)	3,67	(1,61; 8,33)	0,002
Classificação Operacional					
PB	54 (76%)	05 (13%)	1,0		
MB	17 (24%)	34 (87%)	21,60	(7,30; 63,96)	0,000
Classificação de Madrid					
Indeterminada	06 (8%)	0 (0%)	N.C.	N.C.	N.C.
Tuberculóide	11 (15%)	0 (0%)	N.C.	N.C.	N.C.
Dimorfa	54 (76%)	22 (56%)	0,41	(0,25; 0,67)	0,000
Virchowiana	0 (0%)	17 (44%)	1,0		

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: n: número de pacientes; OR: odds ratio; IC (95%): intervalo de confiança (95%); p: significância da relação; N.C.: não calculado - indica que é impossível calcular o OR, pois existe uma célula vazia no modelo.

De acordo com a tabela 24, as variáveis significativas, se consideradas isoladamente, são: sexo, idade (31-45 anos), número de lesões, número de nervos e classificação operacional.

Os resultados obtidos nessa análise apontam a idade como variável potencialmente significativa, entretanto, a ausência de casos com baciloscopia positiva no grupo etário abaixo de 15 anos impossibilita a análise multivariada. Esta constatação levou à procura de um ponto de corte que melhor classificasse os pacientes de acordo com o resultado do exame. A curva ROC, mostrada na Fig. 4, identificou 42,5 anos como corte, onde os indivíduos com idade acima desse valor apresentam menor chance de resultado positivo (correlação de Spearman $r = -0,230$; $p < 0,05$). Este ponto representa a melhor conjugação de sensibilidade (53,8%) e especificidade (69,0%).

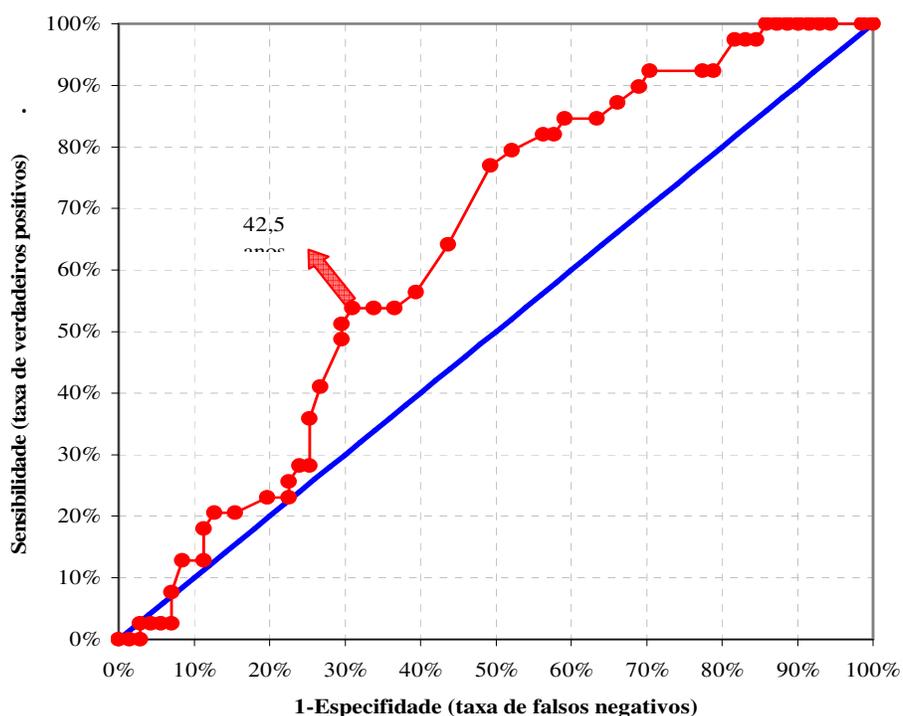


FIGURA 4 – Gráfico com a Curva ROC da idade para baciloscopia positiva pela técnica de Ziehl-Neelsen em quatro sítios.

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: A linha diagonal representa a classificação esperada ao acaso. A área sob a curva foi de 64% ($p < 0,05$), indicando que a idade tem poder discriminante para o resultado do exame.

5.6.2 Análise Multivariada

Para atestar quais variáveis em conjunto exercem efeito sobre o resultado da baciloscopia, procedeu-se à regressão logística multivariada, cujos resultados estão expressos na tabela 25. A variável de interesse – Ziehl-Neelsen em quatro sítios – é binária, portanto, utilizou-se a metodologia de regressão logística binária.

As covariáveis incluídas nesta análise foram todas as que tiveram probabilidade de significância inferior a 0,25 na análise bivariada, como sugerido por Mickey e Greenland (1989), devido ao fato de que os níveis usuais, como 0,05, freqüentemente não conseguem identificar variáveis importantes. A idade foi categorizada em dois grupos – até 42 anos e maior que 42 anos – de acordo com o ponto de corte obtido pela curva ROC. Deve-se ressaltar que, como a variável classificação operacional apresenta o mesmo significado da variável número de lesões, somente a última foi incluída no modelo multivariado.

TABELA 25

Associação entre a positividade do teste de Ziehl-Neelsen em quatro sítios e as covariáveis do estudo na análise multivariada dos 110 casos novos de hanseníase atendidos no HEM/FHEMIG, no período de setembro de 2006 a outubro de 2007

Variáveis	Coefficiente	S.E.	WALD	EXP(B)	IC (95%)	p-valor
Sexo						
Feminino				1,0		
Masculino	0,56	0,57	0,95	1,74	(0,57; 5,33)	0,33
Idade						
≤ 42 anos	0,90	0,54	2,76	2,47	(0,85; 7,16)	0,10
> 42 anos				1,0		
Numero de lesões						
≤ 5 lesões				1,0		
> 5 lesões	2,96	0,58	25,75	19,29	(6,15; 60,48)	0,00
Numero de nervos						
≤ 1 nervo				1,0		
> 1 Nervos	1,25	0,55	5,26	3,51	(1,20; 10,25)	0,02
Constante	-2,68	0,72	13,97	0,07		0,00

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Coeficiente: coeficiente do efeito da variável sobre o exame baciloscópico; S.E.: erro padrão; Wald: teste do efeito da variável; IC (95%): intervalo de confiança (95%); p: significância da relação; EXP(B): razão de chances, no modelo multivariado, em relação à categoria de referência (OR=1).

Como medidas de ajuste global, o modelo logístico foi capaz de prever corretamente 79,1% dos resultados, produzindo um R^2 de 0,53. Utilizou-se o teste de Hosmer & Lemeshow (1989) para verificar se o modelo é adequado. O teste apresentou uma probabilidade de significância p-valor = 0,920, concluindo que o modelo ajustado é adequado aos dados. Nenhum problema de multicolineariedade foi detectado.

Pode-se observar que o paciente com mais de cinco lesões tem, aproximadamente, 19 vezes (Exp(B): 19,29) a chance de ter baciloscopia positiva, comparando com aquele que apresenta até cinco lesões cutâneas.

O paciente com mais de um nervo comprometido tem, aproximadamente, três vezes (Exp(B): 3,51) a chance de ter baciloscopia positiva, em relação ao paciente com até um nervo acometido.

Entre os pacientes paucibacilares (59/110), 18 (31%) mostraram mais de um nervo acometido e, destes, 14 (78%) apresentaram baciloscopia negativa em todas as técnicas e sítios analisados. A baciloscopia foi positiva em quatro pacientes paucibacilares.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Dos pacientes analisados neste trabalho, o sexo masculino representou a maioria (59,1%). Este achado está em concordância com a literatura (NOORDEEN, 1985; CASTORINA-SILVA, 2003; PFALTZGRAFF, 2003; BRITTON; LOCKWOOD, 2004; CRIPPA et al., 2004; MURTHY, 2004; GROSSI, 2005; LYON, 2005; MOSCHIONI, 2007) e com dados epidemiológicos do Brasil, de Minas Gerais e de Belo Horizonte (BRASIL, 2006a). As mulheres desenvolvem resposta imunológica ao *M. leprae* mais intensa que os homens, como sugerido na maioria dos países, pela menor incidência e menor gravidade da hanseníase no sexo feminino (ULRICH et al., 1993). Além disso, os homens se expõem a maiores riscos de infecção, como resultado do estilo de vida (NOORDEEN, 1985).

A maioria dos pacientes apresentou idade entre 20 e 50 anos (62,7%), ou seja, faixa etária economicamente ativa. Esse dado é relevante, porque esses pacientes têm contato mais intenso com grande parte da população, o que contribui para a disseminação da doença (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). Corroborando com esse dado, as referências indicam que a hanseníase é doença do adulto, com maior número de casos nessa faixa etária (OPROMOLLA, 2000; GROSSI, 2005; LYON, 2005). A média de idade dos pacientes, 46,5 anos, compara-se a de outros estudos, que observaram média de 42 anos (GROSSI, 2005) e 43,9 anos (LYON, 2005).

O surgimento da hanseníase em menores de 15 anos indica a precocidade da exposição ao agente etiológico, determinada pela maior endemicidade (NOORDEEN, 1985; LOMBARDI, 1990). O percentual em menores de 15 anos entre os casos estudados (1,8%) foi menor que em outros estudos, que detectaram 5,7% (MOSCHIONI, 2007) e 6,9% (GROSSI, 2005) em Minas Gerais e 11% em Manaus (CRIPPA et al., 2004). As médias divulgadas pelo DATASUS, para Minas Gerais (3%) e o Brasil (7%), também são superiores (BRASIL, 2006a). Tal fato pode ser explicado pela menor prevalência da doença em Belo Horizonte (0,29), em relação a Minas Gerais (1,11) e Brasil (2,02) (SISTEMA..., 2006) ou pela clientela do serviço.

Quanto ao número de lesões cutâneas, a maior parte dos pacientes (53,6%) apresentou até cinco lesões, correspondendo aos PB de acordo com a classificação operacional. Resultado semelhante foi encontrado no total de casos estudados em Minas Gerais (GROSSI, 2005; BÜHRER-SÉKULA et al. 2007; MOSCHIONI, 2007) e em Manaus (CRIPPA et al., 2004), porém, em centro de referência do Rio de Janeiro, a grande maioria (73,3%) apresentou mais de cinco lesões (GALLO et al., 2003).

O envolvimento de nervos periféricos pela hanseníase é marcador importante de incapacidades e deformidades (MEIMA et al., 2004). Neste estudo, a maioria dos pacientes (60,9%) apresentou um ou nenhum nervo comprometido, concordante com a literatura (GROSSI, 2005; MOSCHIONI, 2007).

Dentre as formas clínicas, o grupo dimorfo apresentou maior prevalência (69,1%), sendo relevante por ser a forma mais importante do espectro em termos de número de pacientes e gravidade dos danos neurais, onde ocorre a maioria das deformidades e incapacidades vistas na hanseníase (PFALTZGRAFF; BRYCESON, 1985; TALHARI; NEVES, 1997; OPROMOLLA, 2000; LYON, 2005).

Utilizando a técnica de Ziehl-Neelsen em quatro sítios como procedimento padrão para a baciloscopia, o percentual de positividade encontrado (35%) foi concordante com o de outros autores, que observaram 27% (GROSSI, 2005), 28,3% (CRIPPA et al., 2004), 31,5% (KEITA et al., 2003), 34,9% (MOSCHIONI, 2007) e 35,9% em estudo realizado na mesma instituição (LYON, 2005), constatando a baixa sensibilidade do exame, conforme referido na literatura (BÜHRER-SÉKULA et al., 2000; SUMMARY..., 2002). Na Índia, a positividade da baciloscopia foi de apenas 8,8% dos 5.165 casos novos de hanseníase registrados no período de 1985 a 2000 (NORMAN et al., 2004). Gallo et al. (2003), entretanto, relataram maior percentual de positividade (77,9%), em centro de referência nacional que, além da demanda primária, atende pacientes provenientes de outros serviços.

6.2 CONCORDÂNCIA INTEROBSERVADOR

O exame baciloscópico auxilia no diagnóstico, na classificação e na escolha do esquema terapêutico da hanseníase. Como qualquer procedimento que envolve mensuração, os resultados exibem algum grau de variação em suas medidas. O

presente estudo se propôs a avaliar a confiabilidade da interpretação da baciloscopia do raspado dérmico de quatro e seis sítios à microscopia óptica e de fluorescência. A confiabilidade é definida como a capacidade de concordância dos resultados quando analisados em tempos distintos ou por diferentes indivíduos. Avaliou-se, neste estudo, o grau de concordância na análise de diferentes examinadores.

Do ponto de vista clínico, interessa se o resultado da baciloscopia é negativo ou positivo, uma vez que isso implicará na escolha do esquema terapêutico e no tempo de tratamento. O paciente com baciloscopia positiva deve ser tratado com doze doses de poliquimioterapia, enquanto aquele classificado como PB e com baciloscopia negativa é tratado com seis doses (BRASIL, 2002). Considerando-se o resultado negativo e positivo, a análise entre os observadores foi feita através do coeficiente Kappa, medida amplamente difundida e adequada quando se deseja observar o grau de concordância em determinado assunto para variáveis dicotômicas. De acordo com os critérios definidos por Landis & Koch (1977), observou-se concordância excelente entre os examinadores, com Kappa de 0,90, 0,88, 0,98 e 0,96, para Ziehl-Neelsen quatro e seis sítios e Auramina quatro e seis sítios, respectivamente.

Sob a ótica laboratorial, avaliaram-se as médias dos valores do IB. A análise pelo ICC mostrou concordância excelente entre os observadores, acima do limite de 0,75 (coeficiente de 0,97, 0,98, 0,99 e 0,99 para Ziehl-Neelsen quatro e seis sítios e Auramina quatro e seis sítios, respectivamente), novamente atestando a confiabilidade das medidas. Esses resultados mostram a reprodutibilidade da técnica, quando executada por profissionais experientes, em concordância com outros autores (DESIKAN et al., 2006; GUPTE et al., 1988).

Considerando a técnica de Ziehl-Neelsen, o teste *t* mostrou que o examinador 1 tende a apresentar maiores médias no IB ($p < 0,05$) mas, dada a magnitude da concordância entre eles, tal diferença pode ser considerada mínima. Em relação à microscopia de fluorescência, não houve diferença estatisticamente significativa entre os examinadores. A utilização do teste *t* neste estudo foi possível, pois, como a amostra global é superior a trinta casos, a normalidade das distribuições não é requisito essencial para aplicação do teste, dada a aproximação da distribuição das médias pelo teorema central do limite (PESTANA; GAGEIRO, 2000).

Entre os oito casos discordantes entre os observadores, considerando-se as técnicas de coloração e os sítios examinados, a maioria foi do sexo masculino (75%) e classificada operacionalmente como MB (75%). De acordo com a classificação de Madrid, todos apresentaram a forma dimorfa da hanseníase. Apesar da discordância dos exames, observou-se que o IB, quando positivo, apresentou baixo valor, podendo significar casos falso-positivos, ou mais provavelmente, casos com escassez de bacilos, o que dificulta sua identificação. Uma das causas de variação dos resultados, quando analisados por pessoas diferentes, pode ser a distribuição irregular de bacilos nos esfregaços. Bhatia et al. (1990) demonstraram que, mesmo em esfregaços com elevado IB, os bacilos não são distribuídos de maneira homogênea, havendo áreas completamente isentas de micobactérias. Nesses esfregaços, a seleção de campos por diferentes observadores pode levar a diferentes resultados. Um esfregaço contém cerca de 1600 a 2600 campos de observação à objetiva de imersão do microscópio (SERUFO et al., 2007b). Gupte et al. (1988) calcularam aproximadamente 4000 campos à objetiva de imersão em esfregaço de 1 cm de diâmetro. Examinando 100 campos, somente 2-7% do esfregaço são percorridos (GUPTE et al., 1988; SERUFO et al., 2007b). A distribuição desigual dos bacilos e o percentual da área examinada são fatores limitantes da técnica, apontando para a casualidade da amostra nos casos discordantes, em especial, aqueles que apresentam escassez de bacilos.

6.3 ANÁLISE ENTRE OS MÉTODOS DE COLORAÇÃO E ENTRE OS SÍTIOS

O diagnóstico bacteriológico da hanseníase depende fundamentalmente do exame microscópico direto. Em decorrência desse fato, vários estudos têm sido realizados comparando os principais métodos de coloração utilizados para essa finalidade. Os resultados, entretanto, são controversos (HENDERSON et al., 1942; PRENDES et al., 1953; MANSFIELD, 1970; LOPES DE FARIA, 1974; JARIWALA; KELKAR, 1979; COLLINS et al., 1980; HARDAS; LELE, 1981; BHATIA et al., 1987; MARTINS et al., 1991; NAYAK et al., 2003).

A técnica de Ziehl-Neelsen é considerada, até o momento, o método de coloração de referência para a detecção de BAAR (MANSFIELD, 1970; COSTA et al., 1988; SOMOSKÖVI et al., 2001). Entretanto, apresenta problemas, como a

baixa sensibilidade e o tempo necessário para o exame dos esfregaços, dificultando a análise de grande número de amostras em determinado tempo.

A microscopia de fluorescência apresenta vantagens em relação ao método padrão, relacionadas ao menor tempo necessário para a leitura dos resultados e à facilidade de detecção de bacilos em menores ampliações pelo contraste dos mesmos brilhando contra um fundo escuro, reduzindo a fadiga do observador e aumentando a acurácia do exame (RICHARDS; MILLER, 1941; MATTHAEI, 1950; GOHAR, 1952; VON HAEBLER; MURRAY, 1954; KHANOLKAR; NERURKAR, 1956; OLIVA, 1958; KUPER; MAY, 1960; COLLINS et al., 1980; KONEMAN et al., 2001; ROBLEDO; MEJÍA, 2001).

No presente estudo, o coeficiente de Spearman demonstrou correlação significativa entre as técnicas de coloração (Spearman: 0,96 e 0,95 para quatro e seis sítios, respectivamente; $p < 0,001$). Deve-se salientar que, apesar deste coeficiente empregar a ordem das variáveis, optou-se por mostrar, nos gráficos das Figs. 2 e 3, a relação entre as medidas considerando tais variáveis como intervalares e seus valores originais.

Do ponto de vista clínico, ou seja, considerando o resultado negativo e positivo da baciloscopia, ambos os métodos de coloração produziram resultados equiparáveis, com concordância excelente segundo os critérios de Landis & Koch (1977), com Kappa de 0,92, 0,88 em quatro e seis sítios, respectivamente. Os casos discordantes ocorreram em ambas as direções, conforme observado nas tabelas 15 e 16, com valores semelhantes. O número de pares discordantes aumentou proporcionalmente à medida que maior número de sítios foi analisado.

Os métodos de coloração não apresentaram diferença entre si quanto à capacidade de detectar positividade, fato constatado através do teste de McNemar, com significância de 100%. A literatura apresenta dados variáveis em relação a essa comparação, corroborando os resultados deste trabalho (MANSFIELD, 1970; MARTINS et al., 1991). Outros estudos evidenciam superioridade da microscopia de fluorescência em relação ao método de Ziehl-Neelsen na detecção do *M. leprae*, seja em cortes histológicos (HENDERSON et al., 1942; MANSFIELD, 1970; JARIWALA; KELKAR, 1979; BHATIA et al., 1987; NAYAK et al., 2003), esfregaços padronizados (COLLINS et al., 1980) ou em raspado dérmico (PRENDES et al., 1953). Há também aqueles que demonstram maior eficácia da carbolfucsina (LOPES DE FARIA, 1974; HARDAS; LELE, 1981).

Cabe ressaltar que a metodologia empregada variou consideravelmente nesses estudos.

Do ponto de vista laboratorial, analisando-se o IB, mais uma vez evidenciou-se confiabilidade excelente entre os métodos de coloração Ziehl-Neelsen e Auramina, tanto em quatro, quanto em seis sítios (ICC: 0,99). Este resultado é compatível ao encontrado por outros autores (MANSFIELD, 1970; MARTINS et al., 1991).

A técnica da Auramina visualizou, em média, mais bacilos que a técnica de Ziehl-Neelsen ($p < 0,05$), tanto em quatro quanto em seis sítios, ou seja, foi mais eficaz na determinação do IB (Tabela 20). A microscopia de fluorescência examina maior área do esfregaço em decorrência de rastreá-lo com a objetiva de 40X, cujo campo é cerca de cinco vezes maior que aquele visualizado à objetiva de imersão no método de Ziehl-Neelsen. Esse achado é concordante com a literatura, que evidencia maior facilidade da microscopia de fluorescência em detectar bacilos, particularmente em decorrência do menor aumento exigido e maior contraste dos mesmos brilhando contra o fundo escuro, justificando as contagens de bacilos por campo mais elevadas (COLLINS et al., 1980; MARTINS et al., 1991). Essa superioridade varia com o número de bacilos presentes no material, sendo que, quanto menor, maior a probabilidade de serem detectados pelo método fluorescente (GOHAR, 1952; KHANOLKAR; NERURKAR, 1956; JARIWALA; KELKAR, 1979; BHATIA et al., 1987; NAYAK et al., 2003).

A possibilidade de artefatos na microscopia fluorescente deve ser levada em conta, uma vez que pode ocasionar resultados falso-positivos (VON HAEBLER; MURRAY, 1954; HARDAS; LELE, 1981). Esta constatação ressalta a importância de técnicos experientes na leitura do exame (SILVER et al., 1966).

Em relação ao número de sítios envolvidos no exame baciloscópico, apesar de o MS preconizar a utilização de quatro sítios de coleta (BRASIL, 2002), alguns serviços de referência realizam a pesquisa de BAAR em seis sítios, entre eles o Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, no Rio de Janeiro e o Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, São Paulo (GALLO et al., 2000; GALLO et al., 2003; LASTÓRIA et al., 2006).

Verificou-se elevado nível de confiabilidade entre quatro e seis sítios, por ambos os métodos de coloração, tanto do ponto de vista clínico, quanto em

relação ao IB, com grau de concordância considerado excelente pelo Kappa e o ICC.

O exame de seis sítios detectou positividade em dois casos além daqueles detectados no de quatro sítios, por ambos os métodos de coloração, porém o teste de McNemar não mostrou significância estatística ($p = 0,50$). Essa observação é notória, pois, com maior número de sítios analisados, a chance de se detectar bacilos aumenta. Entretanto, para que esta tendência fosse considerada crítica ($p < 0,05$), seriam necessárias cinco observações discordantes, o que seria obtido com uma amostra de aproximadamente 275 casos, garantindo um poder do teste da ordem de 75%. Outro modo de verificar essa tendência seria a observação de maior número de campos nos esfregaços de quatro sítios, em casos de baciloscopia negativa.

O exame de quatro sítios detectou, em média, mais bacilos que o de seis sítios, independente do método de coloração utilizado, mostrado pelo teste *t*. Uma justificativa seria a menor probabilidade de encontro do agente nos joelhos em relação aos lóbulos e cotovelos, referida na literatura (KAUR et al., 1980). O lóbulo auricular é considerado o local onde se encontram maior número de bacilos, quando comparado aos cotovelos e joelhos (KAUR et al., 1980; KUMAR; KAUR, 1986; SUJAI et al., 1997). No presente estudo, considerando a técnica de Ziehl-Neelsen em quatro sítios, a comparação entre as médias dos diferentes sítios mostrou não haver diferença entre lóbulos auriculares e cotovelos ($p = 0,63$) e haver diferença significativa entre lóbulos e joelhos ($p = 0,000006$). No entanto, considerando os elevados índices de confiabilidade entre os métodos de coloração e o número de sítios, pode-se supor que tais resultados não determinam diferenças com significado prático.

6.4 BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL

Com a introdução da poliquimioterapia para a hanseníase na década de 1980, surgiu a necessidade de uma classificação mais acurada que possibilitasse a correta alocação do paciente no esquema terapêutico, tendo em vista as diferenças na associação dos quimioterápicos e duração do tratamento. Os esquemas foram padronizados para dois grupos de pacientes, os PB e os MB. A classificação operacional, que considera apenas o número de lesões cutâneas,

devido à fácil aplicabilidade e ao baixo custo, ganhou rápida adesão nos programas de controle da doença (BRASIL, 2002).

No presente estudo, observou-se concordância moderada entre os métodos de coloração e a classificação operacional, de acordo com os critérios de Landis & Koch (1977) – Kappa de 0,59 para Ziehl-Neelsen em quatro e seis sítios e 0,52 para Auramina em quatro e seis sítios. Este resultado é confirmado pela literatura, cujos trabalhos mostram grau de concordância variando de moderado a substancial, com Kappa de 0,40 (KEITA et al., 2003), 0,66 (BÜHRER-SÉKULA et al., 2000) e 0,68 (GALLO et al., 2003).

Em relação aos casos discordantes, 12,8% dos pacientes com baciloscopia positiva pela metodologia preconizada pelo MS – Ziehl-Neelsen em quatro sítios – foram classificados clinicamente como PB e 23,9% daqueles com exame negativo foram classificados como MB. Outros estudos mostram resultados equiparáveis. No Rio de Janeiro, 10,4% dos pacientes com baciloscopia positiva apresentaram até cinco lesões de pele e 16,2% daqueles com baciloscopia negativa apresentaram mais de cinco lesões (GALLO et al., 2003). Em Manaus, 26,4% dos pacientes com baciloscopia positiva e 14,4% daqueles com exame negativo seriam erroneamente classificados operacionalmente como PB e MB, respectivamente, com conseqüências danosas para os mesmos e para o programa de controle da doença (CRIPPA et al., 2004). Bühner-Sékula et al. (2000) observaram 14,6% dos pacientes com baciloscopia positiva classificados clinicamente como PB e 19,4% daqueles com exame negativo classificados como MB. Na Etiópia, 1,5% dos pacientes classificados como PB apresentaram baciloscopia positiva e, em 21,1% dos MB, não houve confirmação baciloscópica (BECX-BLEUMINK, 1991).

Corroborando com o presente estudo, as referências já citadas indicam que a classificação baseada em critérios clínicos apresenta sensibilidade razoável em detectar casos MB, mas especificidade menor, fazendo com que parcela significativa de pacientes PB seja tratada com esquema multibacilar, podendo resultar em efeitos adversos graves e em aumento dos gastos nos serviços de saúde (GROENEN et al., 1995; RAMESH; PORICHHA, 1996; CROFT et al., 1998; BÜHRER-SÉKULA et al., 2000; CASTORINA-SILVA, 2003; GALLO et al., 2003; KEITA et al., 2003; CRIPPA et al., 2004; NORMAN et al., 2004; GROSSI, 2005; LYON, 2005).

Dos pacientes clinicamente PB que apresentaram baciloscopia positiva, a microscopia de fluorescência detectou dois casos além daqueles detectados pelo método de Ziehl-Neelsen, podendo significar casos falso-positivos ou sensibilidade maior do método em detectar bacilos quando esses são escassos. A presença de artefatos pode resultar em exames falso-positivos, sendo prudente sua interpretação por técnico experiente (VON HAEBLER; MURRAY, 1954; SILVER et al., 1966; HARDAS; LELE, 1981). O exame em maior número de sítios tende a detectar mais casos positivos, mas esse número foi muito pequeno, não apresentando importância clínica.

O exame baciloscópico ainda parece insubstituível para a correta alocação nos diferentes regimes de tratamento, devendo a classificação orientada apenas em critérios clínicos ficar restrita às localidades onde esse exame não esteja disponível.

6.6 BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO DE MADRID

Observou-se forte associação entre os resultados laboratoriais e a classificação de Madrid, de acordo com o teste qui quadrado ($p < 0,001$). A baciloscopia mostrou-se negativa nos pacientes classificados como tuberculóides, positiva nos virchowianos, e apresentou resultados variáveis na forma dimorfa, em concordância com dados da literatura (REES, 1985; ARAÚJO, 2003).

Considerando o total de pacientes, foi constatado o mesmo percentual (35%) de positividade da baciloscopia por ambos os métodos de coloração. Os estudos existentes mostram resultados controversos. Jariwala e Kelkar (1979) e Nayak et al. (2003) observaram maior percentual de positividade da microscopia de fluorescência em relação à carbolfucsina, enquanto Lopes de Faria (1974) observou o contrário; entretanto, não foi realizada análise estatística nesses estudos para verificar a significância dos dados.

Considerando as formas clínicas, a microscopia de fluorescência detectou positividade em um caso indeterminado, e deixou de identificar um caso dimorfo que o método de Ziehl-Neelsen havia detectado, no exame em seis sítios. A literatura mostra que pacientes com carga bacilar baixa dificilmente apresentam positividade ao exame baciloscópico, sendo a microscopia de fluorescência

interessante nesses casos, pela maior probabilidade de detecção de bacilos (BHATIA et al., 1987). Uma amostra não é exatamente igual à outra, por mais homogênea que seja, o que justificaria a discordância dos exames em alguns casos, principalmente aqueles PB. Além disso, no presente estudo, as técnicas de coloração de Ziehl-Neelsen e da Auramina foram executadas em lâminas diferentes.

Comparando o número de sítios analisados, observou-se maior positividade quando a baciloscopia foi realizada em seis sítios, por ambas as técnicas de coloração – dois casos a mais. A observação de maior número de sítios tende a maior probabilidade de identificar bacilos em pacientes PB.

6.6 FATORES ASSOCIADOS À POSITIVIDADE DA BACILOSCOPIA

A análise bivariada foi possível apenas nos subgrupos constituídos tanto por pacientes com resultado positivo quanto por aqueles com resultado negativo à baciloscopia. Nos subgrupos constituídos por pacientes com apenas um tipo de resultado (positivo ou negativo), ficaram categorias vazias, não sendo possível calcular a razão de chances, pois isto implicaria na divisão por zero. Esse fato justifica a ausência de cálculo na análise do subgrupo com idade até 15 anos e da variável classificação de Madrid. Foi possível analisar apenas o subgrupo dimorfo nesta variável, que apresentou chance 59,3% menor de ter resultado positivo na baciloscopia, em relação ao grupo virchowiano.

As variáveis sexo, idade (31 a 45 anos), número de lesões cutâneas, número de nervos acometidos e classificação operacional apresentaram significância estatística em relação à positividade da baciloscopia na análise bivariada. Cabe ressaltar que o modelo bivariado não leva em conta as correlações entre as variáveis, fazendo com que as estimativas de razão de chances sejam consideradas vieses quando seu efeito conjunto não é analisado no modelo multivariado.

Na análise multivariada, a categorização da idade de acordo com o ponto de corte obtido pela curva ROC – até 42 anos e maior que 42 anos – possibilitou a obtenção de estimativas com número adequado de casos e maior precisão na discriminação dos resultados positivos. Para que a variável classificação de

Madrid fosse incluída nesta análise, seria necessário o agrupamento das categorias indeterminada, tuberculóide e virchowiana em uma só categoria, o que resultaria em incoerência e ambigüidade, por serem incompatíveis. Assim, não foi possível incluir esta variável no modelo de regressão (TABACHINICK; FIDELL, 2003).

Constatou-se associação significativa da positividade da baciloscopia com a presença de mais de cinco lesões cutâneas (Exp(B): 19,29) e de mais de um nervo acometido (Exp(B): 3,51). Esses dados confirmam as características e o perfil do MB (GROSSI, 2005; LYON, 2005) e estão de acordo com o critério de classificação recomendado pela OMS anterior ao ano 2000, que considerava MB o paciente com mais de cinco lesões de pele e/ou mais de um nervo acometido (WHO, 1997). No entanto, a avaliação neurológica é muito subjetiva e a inclusão da variável “número de nervos acometidos” no critério de classificação acrescentaria 14 novos casos ao grupo MB, resultando em tratamento desmedido. Portanto, mostra-se acertada a exclusão desse critério da classificação operacional.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1. A maioria dos pacientes incluídos foi do sexo masculino, com idade entre 20 e 50 anos, com até cinco lesões cutâneas e até um nervo comprometido, classificados como PB pela classificação operacional e como dimorfos pela classificação de Madrid.
2. Observou-se excelente concordância da baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O entre diferentes observadores.
3. O estudo mostrou excelente concordância entre as técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e entre o número de sítios examinados.
 - a. A microscopia de fluorescência mostrou-se superior à coloração rotineiramente utilizada na visualização de maior número de bacilos, mas, do ponto de vista clínico, considerando o resultado negativo e positivo, não houve diferença entre as técnicas.
 - b. A baciloscopia apresentou tendência a maior positividade quando maior número de sítios foi analisado, porém, sem significância estatística.
 - c. Considerando a concordância dos resultados e as desvantagens do método fluorescente, como necessidade de sistema de iluminação adequado, custo do aparelho de microscopia e exigência de técnicos experientes na interpretação do exame, pode-se afirmar que a técnica de Ziehl-Neelsen permanece como coloração padrão.
 - d. A técnica fluorescente, assim como a análise de maior área, seja por aumento do número de sítios ou de campos examinados, podem constituir opções para aumentar a sensibilidade da baciloscopia em casos PB com resultado negativo em quatro sítios.
4. Observou-se concordância moderada entre a baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e a classificação operacional do Ministério da Saúde.
5. Houve associação estatisticamente significativa entre a baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O e a classificação de Madrid.
6. A positividade do exame baciloscópico foi estatisticamente associada aos pacientes com mais de cinco lesões cutâneas e com mais de um nervo comprometido, não havendo associação com sexo e idade.

LIMITAÇÕES

8 LIMITAÇÕES

1. A inexistência de um método padrão-ouro para a confirmação do agente etiológico da hanseníase impossibilitou a realização de testes estatísticos para avaliar a sensibilidade e especificidade dos métodos de coloração. A técnica de PCR mostra-se promissora em relação a essa análise.
2. O exame baciloscópico, apesar de ser o método complementar mais útil no diagnóstico da hanseníase, apresenta limitações. Seu resultado é dado pela média aritmética do exame de quatro esfregaços. Um único esfregaço contém milhares de campos de observação à objetiva de imersão do microscópio, entretanto, o resultado é dado pela observação de apenas 100 campos. Como os pacientes PB apresentam escassez de bacilos, estes podem não ser visualizados nos campos escolhidos, sendo necessária a observação de maior área do esfregaço. Esta constatação é de difícil aplicabilidade prática, pelo tempo requerido na leitura dos exames.
3. O teste de McNemar evidenciou maior tendência de resultados positivos quando o número de sítios analisados foi maior. Porém, não houve significância estatística, pelo tamanho da amostra envolvida. Seria necessária amostra maior, para que essa relação pudesse ser determinada.
4. A classificação de Ridley & Jopling, apesar de muito utilizada em nível de pesquisa, e o teste sorológico ML Flow – que vem apresentando resultados favoráveis na classificação final dos pacientes – não foram utilizados neste estudo.

PROPOSIÇÕES

9 PROPOSIÇÕES

A partir dos resultados deste estudo, propõe-se:

1. avaliar a associação entre os métodos de coloração utilizados na baciloscopia do raspado dérmico e a técnica de PCR em cortes histológicos, incluindo sua sensibilidade e especificidade, considerando a biologia molecular como método confirmatório da presença do *M. leprae*.
2. estudar maior número de casos – sugere-se amostra de 275 pacientes – a fim de confirmar se a análise de maior número de sítios proporciona aumento na detecção de bacilos.
3. avaliar se o aumento do número de campos examinados aumenta a probabilidade de detecção de bacilos em casos de baciloscopia negativa em quatro sítios, quando comparada ao resultado em seis sítios.
4. estudar a associação entre baciloscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e Auramina O, classificação de Ridley & Jopling, grau de incapacidade e teste sorológico ML Flow.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M.G. Hanseníase no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.36, n.3, p.373-82, maio/jun. 2003.
- BECHELLI, L.M.; CURBAN, G.V. **Compêndio de Dermatologia**. 4.ed. São Paulo: Atheneu. 1975.
- BECX-BLEUMINK, M. Allocation of patients to paucibacillary or multibacillary drug regimens for the treatment of leprosy – a comparison of methods based mainly on skin smears as opposed to clinical methods for classification of patients. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.** v.59, n.2, p.292-303, 1991.
- BHATIA, V.N.; RAO, S.; SARASWATHI, G. Auramine staining in histopathology sections. **Indian J. Lepr.**, v.59, n.4, p.386-9, Oct/Dec. 1987.
- BHATIA, V.N. et al. Some observations on skin smear examination. **Indian J. Lepr.**, v.62, n.3, p.338-45, Jul/Sep. 1990.
- BOGEN, E. Detection of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. **Amer. Rev. Tuberc.**, v.44, p.267-71, 1941.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. **Hanseníase – Atividades de Controle e Manual de Procedimentos**. Brasília, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS / SINAN / MS / IBGE**. 2006a. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 15 fev. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Controle da hanseníase: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro, 1989a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Guia de Controle da Hanseníase**. Brasília, DF, 1994.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Normas técnicas e procedimentos para o exame baciloscópico em hanseníase**. Brasília, DF, 1989b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para o controle da hanseníase**. Brasília, 2002. (Cadernos de Atenção Básica, n.10).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase. **Plano nacional de eliminação da hanseníase em nível municipal 2006-2010**. Brasília, 2006b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Área Técnica de Dermatologia Sanitária. **Legislação sobre o controle da hanseníase no Brasil, 2000**. Brasília, DF, 2000.
- BRITTON, W.J.; LOCKWOOD, N.L. Leprosy. **The Lancet**, v.363, p.1209-19, 10 Apr. 2004.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Use of ML dipstick as a tool to classify leprosy patients. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.68, p. 456-63, 2000.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of cases with high risk of developing leprosy. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.5, p.1991-5, May 2003.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. The ML Flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients. **Lepr. Rev.**, v.78, n.1, p.70-9, Mar. 2007.

CASTORINA-SILVA, R. **Efeitos adversos mais freqüentes das drogas em uso para o tratamento da hanseníase e suas implicações no controle da endemia.** Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina, UFMG, 2003.

COLLINS, H.M. et al. Microscopic counts carried out on *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* suspensions. A comparison of three staining procedures. **Int. J. Lepr.**, v.48, n.4, p.402-7, 1980.

COSTA, H.C. et al. Estudo comparativo das variantes do método de coloração de micobactérias. **Hansenol. Int.**, v.13, n.2, p.37-41, 1988.

CRIPPA, I.L.F. et al. Correlação clínico laboratorial baseada em dados secundários dos casos de hanseníase atendidos no período de 01/2000 a 03/2001 na Fundação Alfredo da Matta, Manaus-AM, Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.79, n.5, p. 547-54, set./out. 2004.

CROFT, R.P. et al. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin smears examination. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.66, n.4, p.445-50, 1998.

DESIKAN, K.V. et al. Appraisal of skin smear reports of field laboratories. **Lepr. Rev.**, v.77, n.4, p.311-16, Dec. 2006.

FINE, P.E.M. Leprosy: The epidemiology of a slow bacteria. **Epidemiol. Rev.** v.4, p.161-88, 1982.

FREIMAN, D.; MOKOTOFF, G. Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. **Amer. Rev. Tuberc.**, v.48, p.435-42, 1943.

GALLO, M.E.N. et al. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.75, n.3, p.291-7, mai./jun. 2000.

GALLO, M.E.N. et al. Hanseníase multibacilar: índices baciloscópicos e viabilidade do *M. leprae* após 24 doses da PQT/OMS. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.78, n.4, p.415-24, jul./ago. 2003.

GOHAR, M.A. A note on fluorescence microscopy in the diagnosis of leprosy. **J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, n.7, p.156-7, July 1952.

GOULART, I.M.B.; PENA, G.O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v.35, n.4, p. 365-75, jul./ago. 2002.

GROENEN, G. et al. Classification of leprosy cases under field conditions in Bangladesh I. Usefulness of skin-smears examinations. **Lepr. Rev.**, v.66, n.2, p.126-35, Jun.1995.

GROSSI, M.A.F. **Estudo das possíveis mudanças na classificação da hanseníase com a utilização do teste ML Flow e suas implicações no tratamento e controle da endemia em Minas Gerais.** 2005. 197f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GUPTA, M.D. et al. Reliability of direct skin smear microscopy in leprosy. **Indian J. Lepr.**, v.60, n.4, p.566-71, Oct. 1988.

HARBOE, M. The immunology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy.** Edinburgh: Churchill-livingstone, 1985. Cap. 4, p.53-87.

HARDAS, V.; LELE, V. Evaluation of fluorescent microscopy for detection of *M. Leprae*. **Lepr. India**, v.53, n.2, p.273-7, Apr. 1981.

HENDERSON, H.J.; SPAULDING, E.H.; GAULT, E.S. Demonstration of globi and leprosy bacilli by fluorescence microscopy. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v.50, p.91-2, 1942.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. **Applied logistic regression.** New York: John Wiley, 1989.

INTERNATIONAL CONGRESS OF LEPROSY 6. MADRID 1953. Report of the committee on classification. **Int. J. Lepr.**, v.21, p.504-16, 1953.

JAESHKE, R.; GUYATT, G.H.; SACKETT, D.L. Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. **JAMA**, v.271, n.9, p.703-7, Mar. 1994.

JARIWALA, H.J.; KELKAR, S.S. Fluorescence microscopy for detection of *M. leprae* in tissue sections. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.47, n.1, p.33-6, 1979.

KATOCH, V.M. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy. **Expert Rev. Mol. Med.**, v.4, n.15, p.1-14, 22 Jul. 2002.

KAUR, S. et al. Choice of skin slit smears for study of bacterial and morphological indices. **Lepr. India**, v.52, n.4, p.540-7, Oct. 1980.

KEITA, S. et al. Evaluation da la classification clinique des nouveaux cas de lèpre. Etude réalisée à l'Institut Marchoux (Bamako, Mali). **Ann. Dermatol. Venerol.**, v.130, p.184-6, 2003.

KHANOLKAR, V.R.; NERURKAR, R.V. Use of fluorescence microscopy in the diagnosis of leprosy. **Indian J. Med. Res.**, v.44, n.3, p.397-402, July 1956.

KOCH, M.L.; COTE, R.A. Comparison of fluorescence microscopy with Ziehl-Neelsen stain for demonstration of acid-fast bacilli in smear preparations and tissue sections. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v.91, p.283-4, 1965.

KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico**: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

KUMAR, B.; KAUR, S. Selection of sites for slit skin smears in untreated and treated leprosy patients. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.54, n.4, p.540-4, Dec. 1986.

KUPER, S.W.; MAY, J.R. Detection of acid-fast organisms in tissue sections by fluorescence microscopy. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.79, p.59-68, 1960.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.C. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p.159-74, 1977.

LASTÓRIA, J.C. et al. Índices baciloscópico e morfológico na hanseníase após doze doses do esquema poliquimioterápico (PQT/OMS). **Hansenol. Int.**, v.31, n.1, p.101-6, 2006.

LEBOEUF, M.A.A.; GROSSI, M.A.F. **Prevalência oculta de hanseníase nas áreas de abrangência das diretorias regionais de saúde**. Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Minas Gerais, 2000.

LIND, H.E. Limitations of fluorescent microscopy for detection of acid-fast bacilli. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.19, p.72-5, 1949.

LOMBARDI, C. Hanseníase: epidemiologia e controle. São Paulo: Instituto Médico de São Paulo, 1990. Cap.3, p.28-42.

LOPES DE FARIA, L. Fluorescent staining for *Mycobacterium leprae* in tissue sections. Comparison with Fite-Faraco procedure. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.42, n.1, p.52-4, 1974.

LÓPEZ-ANTUÑANO, F.J. Diagnóstico y tratamiento de la lepra. **Salud Publica Mex.**, v.40, n.1, p.66-75, ene./feb. 1998.

LYON, S. **Estudo comparativo da carga bacilar em casos novos de hanseníase e o resultado do teste sorológico ML Flow**. 2005. 137f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MANSFIELD, R.E. An improved method for the fluorochrome staining of mycobacteria in tissues and smears. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.53, p.394-406, Mar. 1970.

MARTINS, M.C. et al. Microscopia de fluorescência como procedimento para a realização do exame baciloscópico em hanseníase. **Hansen. Int.**, v.16, n.1/2, p.29-34, 1991.

MATTHAEI, E. Simplified fluorescence microscopy of tubercle bacilli. **J. Gen. Microbiol.**, v.4, p.393-8, 1950.

MEIMA, A.; RICHARDUS, J.H.; HABBEMA, J.D.F. Trends in leprosy case detection worldwide since 1985. **Lepr. Rev.**, v.75, n.1, p.16-33, Mar. 2004.

MENZ, H. B. et al. Reliability of the GAITRite walkway system for the quantification of temporo-spatial parameters of gait in young and older people. **Gait Posture**, v.20, n.1, p.20-25, Aug. 2004.

MICKEY, J.; GREENLAND, S. A study of the impact of confounder – selection criteria on effect estimation. **Am. J. Epidemiol.**, v. 129, p.125-37, 1989.

MOSCHELLA, S.L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.51, n.3, p.417-26, Sept. 2004.

MOSCHIONI, C. **Fatores de risco para incapacidade física anotados no momento do diagnóstico de 19.283 casos novos de hanseníase, no período de 2000 a 2005, em Minas Gerais, Brasil. 2007.** 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MURRAY, S.J. et al. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. **J. Clin. Pathol.**, v.56, n.8, p.613-5, 2003.

MURTHY, P.K. Clinical manifestations, diagnosis and classification of leprosy. **J. Indian Med. Assoc.**, v.102, n.12, p.678-9, Dec. 2004.

NAYAK, S.V.; SHIVARUDRAPPA, A.S.; MUKKAMIL, A.S. Role of fluorescent microscopy in detecting *M. leprae* in tissue sections. **Ann. Diagn. Pathol.**, v.7, n.2, p.78-81, 2003.

NIERO, R.; BELLO, M.J.A.; POSSAS, J.S.B. Estudo comparativo entre os métodos de coloração fluorescente e Ziehl-Neelsen em secreções pulmonares. **Rev. Saúde Públ.**, v.12, p.250-7, 1978.

NOORDEEN, S.K. The epidemiology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy.** Edinburgh: Churchill-livingstone, 1985. Cap. 2, p.15-30.

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. Lepr. Other Micobact. Dis.**, Paris, France, v.72, n.3, p. 278-83, 2004.

OLIVA, J. M. A microscopia fluorescente na pesquisa do bacilo de Koch. **Arq IBIT**, v.17, p.163-8, 1958.

OPROMOLLA, D.V.A. **Noções de Hansenologia.** Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.

OPROMOLLA, P. A.; MARTELLI, A. C. C. A terminologia relativa à hanseníase. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.80, n.3, p.293-4, 2005.

OSKAM, L.; SLIM, E.; BÜHRER-SÉKULA, S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: A state of the art overview. **Lepr. Rev.**, v.74, n.3, p.196-205, Sept. 2003.

PESTANA, M. H. GAGEIRO, J. N. **Análise de Dados para Ciências Sociais – A Complementaridade do SPSS.** 2. ed. Lisboa: Edições Sílabo, 2000.

PFALTZGRAFF, R.E; BRYCESON, A. Clinical leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy.** Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1985. Cap.7, p.134-76.

PFALTZGRAFF, R.E. What is the actual male/female sex ratio in leprosy patients? **Lepr. Rev.**, v.74, n.2 p.180-1, Jun. 2003.

PORICHHA, D. A plea to revive skin smear examination. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, Paris, France, v.69, n.1, p.116-9, 2001.

PRENDES, M.A.G. et al. La microscopia fluorescente em leprologia. Valoracion del método fluorescente frente al Ziehl-Neelsen em el diagnostico bacteriológico. **Int. J. Lepr.**, v.21, n.1, p.35-40, 1953.

RAMESH, V.; PORICHHA, D. Practical problems in the management of leprosy. **Lepr. Rev.**, v.67, n.4, p.330-6, Dec. 1996.

REES, R.J.W. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1985. Cap.3, p.31-52.

REES, R.J.W. The impact of experimental human leprosy in the mouse on leprosy research. **Int. J. Lepr.**, v.39, p.201-15, 1971.

RICHARDS, O.W.; MILLER, D.K. An efficient method for the identification of tuberculosis bacteria with a simple fluorescent microscope. **Am. J. Clin. Pathol. Tech.**, n.5 (supp.), p.1-8, 1941.

RIDLEY, D.S.; JOB, C.K. The pathology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1985. Cap.6, p.100-33.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr.**, v.34, p.255-73. 1966.

ROBLEDO, J.; MEJÍA, G.I. Actualidad en el diagnóstico de tuberculosis por el laboratorio. **Infectio**, v.5, n.4, p.251-9, 2001.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas. 2000. Cap.40, p.467-88.

SCOLLARD, D. M. et al. The continuing challenges of leprosy. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.19, n.2, p.338-81, Apr. 2006.

SERUFO, J.C.; REIS, C.M.F.; SANTOS, S.G. **POP Micra: Pesquisa de BAAR**. Método de coloração fluorescente – Auramina. ISO 9002-2007, versão 01, 2007a.

SERUFO, J.C.; REIS, C.M.F.; SANTOS, S.G. **POP Micra: Pesquisa de BAAR**. Técnica de Ziehl-Neelsen. ISO 9002-2007, versão 01, 2007b.

SHROUT, P. E.; FLEISS, J. L. Intraclass Correlations: uses in assessing rater reliability. **Psychological Bulletin**, v.86, n.2, p.420-428, 1979.

SILVER, H. et al. Modifications in the fluorescence microscopy technique as applied to identification of acid-fast bacilli in tissue and bacteriological material. **J. Clin. Path.**, v.19, p.583-7, 1966.

SINGH, N.P.; PARIJA, S.C. The value of fluorescence microscopy of auramine stained sputum smears for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v.29, n.4, p.860-3, 1998.

SINGH, P.A. et al. Clinico-histopathological concordance in leprosy. **Trop. Doct.**, v.30, n.4, p.228-31, 2000.

SIQUEIRA, L.F.G.; ALMEIDA, R.G.; BELDA, W. Métodos tintoriais utilizados na identificação do *Mycobacterium leprae*: revisão histórica. **Rev. Saúde Pública**, v.18, n.3, p.246-58, out. 1984.

SISTEMA de informações de agravos de notificação. **Informações de Saúde. DATASUS**. 2006. Disponível em: <www.datasus.gov.br>. Acesso em: 01 jul. 2007.

SOARES, J.F.; SIQUEIRA, A.L. **Introdução à estatística médica**. 2. ed. Belo Horizonte: Coopmed, p.181-6 e 189-90, 2002.

SOMOSKÖVI, A. et al. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. **Chest**, v.120, p.250-7, July 2001.

SOUZA, C. S. **Hanseníase**: formas clínicas e diagnóstico diferencial. Ribeirão Preto, v.30, p.325-34, jul./set. 1997.

SUJAI, S. et al. Skin smears in leprosy: is reduction in number of sites justified? **Acta Leprol.**, v.10, n.4, p.191-4, 1997.

SUMMARY of the Report of the International Leprosy Association Technical Forum. **Int. J. Lepr. Other Micobact. Dis.**, Paris, France, v.70, n.1 (supp.), Mar. 2002.

TABACHINIK, B. G.; FIDELL, L. S. **Using Multivariate Statistics**. 3. ed. New York: HarperCollins, 2003.

TALHARI, S.; NEVES, R.G. **Hanseníase**. 3.ed. Manaus, 1997. 167p.

TRUANT, J.P.; BRETT, W.A.; THOMAS, W. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli-stained with auramine and rhodamine. **Henry Ford Hosp. Med. Bull.**, v.10, p.287-96, 1962.

ULRICH, M. et al. Leprosy in women: characteristics and repercussions. **Society of Science Medicine**. New York, v.37, n.4, p.445-56, Aug. 1993.

USTIANOWSKI, A.P.; LOCKWOOD, D.N.J. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.16, n.5, p.421-7, Oct. 2003.

VOGELSANG, T.M. Gerhard Hennk Armauer Hansen 1841-1912. The discoverer of the leprosy bacillus. His life and his work. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v.46, n.3-4, p.257-332, 1978.

VON HAEBLER, T.; MURRAY, J.F. Fluorescence microscopy as a routine method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. **S. Afr. Med. J.**, v.28, n.3, p.45-8, 16 Jan. 1954.

WATERS, M.F. To smear or not to smear? **Lepr. Rev.**, v.73, n.3, p.211-4, Sep. 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Leprosy Situation, 2007. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v.82, n.25, p.225-32, 22 Jun. 2007a. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2007>>. Acesso em: 02 dez. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Leprosy Situation – additional information. **Weekly Epidemiological Record**, Geneva, v.82, n.44, p. 388, 2 Nov. 2007b. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2007>>. Acesso em: 02 dez. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guide to the elimination of leprosy as a public health problem**. 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/>>. Acesso em: 10 fev. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leprosy elimination project**. Geneva, 2006. Disponível em: <<http://www.who.int/lep/>>. Acesso em: 10 fev. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **PQT**: perguntas e respostas. Revisão 1997. WHO/LEP/97.8. Geneva, 1997.

ZWEIG, M.H.; CAMPBELL, G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. **Clinical Chemistry**, v.39, p.561-77, 1993.

APÊNDICES

APÊNDICE A	- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO....	102
APÊNDICE B	- FICHA DO PACIENTE.....	104
APÊNDICE C	- TÉCNICA DE ZIEHL-NEELSEN.....	105
APÊNDICE D	- TÉCNICA DA AURAMINA O.....	108
APÊNDICE E	- ANÁLISE EXPLORATÓRIA.....	111
APÊNDICE F	- ANÁLISE DA CONFIABILIDADE INTEROBSERVADOR.....	113
APÊNDICE G	- TESTES T PARA MEDIDAS ENTRE OBSERVADORES.....	115
APÊNDICE H	- CONCORDÂNCIA E ASSOCIAÇÃO ENTRE ZIEHL-NEELSEN E AURAMINA E ENTRE SÍTIOS DIFERENTES – ANÁLISE QUALITATIVA.....	116
APÊNDICE I	- CONFIABILIDADE ENTRE ZIEHL-NEELSEN E AURAMINA E ENTRE SÍTIOS DIFERENTES – ANÁLISE QUANTITATIVA.....	118
APÊNDICE J	- TESTES T PARA MEDIDAS ENTRE EXAMES BACILOSCÓPICOS.....	120
APÊNDICE K	- CONCORDÂNCIA ENTRE A BACILOSCOPIA PELAS TÉCNICAS DE ZIEHL-NEELSEN E AURAMINA E A CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL.....	121
APÊNDICE L	- TESTE QUI QUADRADO DA RELAÇÃO ENTRE BACILOSCOPIA E CLASSIFICAÇÃO DE MADRID.....	122
APÊNDICE M	- CURVA ROC.....	124
APÊNDICE N	- REGRESSÃO LOGÍSTICA.....	126

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “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”.

Este termo de consentimento pode conter palavras que você não entenda. Peça ao pesquisador que explique as palavras ou informações não compreendidas completamente.

1) Introdução

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “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”. Se decidir participar dela, é importante que leia estas informações sobre o estudo e o seu papel nesta pesquisa.

Você pode ter sido selecionado para este estudo por três motivos:

- Ser adulto ou criança maior de cinco anos e estar fazendo acompanhamento no ambulatório de Dermatologia de Hospital Eduardo de Menezes devido à Hanseníase.
- Ser adulto ou criança maior de cinco anos, encaminhado ao ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes para tratamento de hanseníase.
- Ser adulto ou criança maior de cinco anos, contato de paciente com hanseníase, ter comparecido ao ambulatório de Dermatologia do Hospital Eduardo de Menezes para exame de contato, quando foi feito diagnóstico de hanseníase.
- Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar o seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em relação ao seu tratamento.

2) Objetivo

O objetivo desta pesquisa é comparar o exame da baciloscopia em pacientes com diagnóstico recente de hanseníase através de técnicas de coloração diferentes.

3) Procedimento do estudo

Se concordar em participar desta pesquisa você será solicitado a fornecer material para exames laboratoriais. Será colhido material dos lóbulos da orelha, cotovelos e joelhos e, se houver, da lesão de pele, através de uma pequena incisão. **O procedimento é simples e rápido.** Consistirá num pequeno corte superficial da pele, que será feito com lâmina de bisturi descartável, nos locais descritos.

4) Riscos e desconfortos

Pode haver desconforto durante a realização da coleta do raspado dérmico para baciloscopia, no entanto este exame é rotineiramente realizado em todos os pacientes com hanseníase.

5) **Benefícios**

- A pesquisa poderá ou não trazer benefícios a você, mas as informações obtidas por meio deste estudo poderão ser importantes para a identificação de exames de execução mais fácil e rápida, que sejam de maior confiabilidade, para que a hanseníase possa ser diagnosticada precocemente e melhor controlada. Os procedimentos relacionados ao estudo serão inteiramente gratuitos.
- Se diagnosticado algum problema, este será encaminhado para tratamento apropriado.

6) **Caráter confidencial dos registros:**

As informações obtidas a partir de sua participação serão estritamente confidenciais.

7) **Para obter informações adicionais**

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone do pesquisador, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Caso você venha a sofrer algum dano relacionado ao estudo, ou tenha mais perguntas sobre o estudo, por favor, ligue para Juliana Cunha Sarubi, telefone (31) 9123-5322.

8) **Declaração de consentimento**

Li ou alguém leu para mim as informações contidas neste documento antes de assinar este termo de consentimento. Declaro que fui informado sobre o procedimento a ser realizado, as inconveniências, os riscos e benefícios que podem vir a ocorrer em consequência dos procedimentos.

Declaro que tive tempo suficiente para ler e entender as informações acima. Declaro também que toda a linguagem técnica utilizada na descrição deste estudo de pesquisa foi satisfatoriamente explicada e que recebi respostas para todas as minhas dúvidas. Confirmando também que recebi uma cópia do formulário de consentimento. Compreendo que sou livre para me retirar do estudo a qualquer momento, sem perda de benefícios ou qualquer outra penalidade.

Dou meu consentimento de livre e espontânea vontade e sem reservas para participar como paciente deste estudo.

Nome do participante (em letra de forma)

Assinatura do participante ou representante legal

Data

Atesto que expliquei cuidadosamente a natureza e o objetivo deste estudo, os possíveis riscos e benefícios da participação no mesmo, junto ao participante e/ou seu representante autorizado. Acredito que o participante e/ou seu representante recebeu todas as informações necessárias, que foram fornecidas em linguagem adequada e compreensível e que ele/ela compreendeu essa explicação.

Nome do pesquisador

Data

APÊNDICE C

TÉCNICA DE ZIEHL-NEELEN

1. PRINCÍPIO

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 se tornam avermelhados e retêm a cor mesmo após descoloração com mistura de álcool e ácido. A contra coloração, usualmente com azul de metileno, faz com que o restante do esfregaço fique azul.

2. APLICAÇÃO CLÍNICA

Diagnóstico presuntivo das infecções causadas por micobactérias.

3. REAGENTES E INSUMOS

3.1 Material necessário

- Bico de gás
- Fósforo
- Álcool 70%
- Pinça anatômica
- Suporte para lâminas
- Água corrente
- Reservatório com água destilada (10 ou 20 litros)
- Dois funis de vidro de 70 e de 150mm
- Papel de filtro
- Relógio (alarme)
- Duas provetas de pirex de 500ml e 200ml
- Balança de precisão
- Etanol
- Ácido clorídrico concentrado
- Fucsina básica
- Azul de metileno
- Cristais de fenol (ácido fênico)
- Três frascos cor âmbar de 500ml (estoque)

3.2 Bateria de corantes Ziehl-Neelsen

3.2.1 Solução de fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen

Fucsina básica	-----	1g
Etanol	-----	10ml
Ácido fênico	-----	5g
Água destilada	-----	100ml

Triturar a fucsina com o álcool em graal. Juntar o ácido fênico, continuando a triturar. Adicionar cerca de 60ml de água destilada morna, agitar e transferir a solução para um frasco. Deixar em repouso durante 24 horas. Filtrar a solução e estocar em frasco escuro (cor âmbar).

3.2.2 Solução descorante álcool-ácida

Ácido clorídrico concentrado	-----	1ml
Etanol	-----	99ml

Adicionar 1ml de ácido clorídrico concentrado, gota a gota, em 99ml de etanol.

3.2.3 Solução de azul de metileno

Azul de metileno	-----	0,3g
Água destilada	-----	100ml

Adicionar 0,3g de azul de metileno em 100ml de água destilada, agitar bem até o azul de metileno estar diluído, filtrar e estocar em frasco escuro.

3.3 Recomendações gerais

As soluções apresentam validade de 1 ano à temperatura ambiente e devem ser guardadas em frasco âmbar.

As soluções corantes devem ser filtradas sempre que forem utilizadas. Este procedimento é particularmente necessário para a fucsina fenicada porque, com o tempo, formam-se pequenos cristais que se depositam na lâmina formando artefatos e causando erro nas leituras.

3.4 Técnica de coloração - Ziehl-Neelsen

Os métodos de coloração por calor ou a frio podem ser utilizados, e ambos são descritos no manual do MS (BRASIL, 1989). O método a frio, utilizado no presente estudo, é descrito abaixo:

- Se não houver certeza de que a lâmina foi fixada, passar vagarosamente sobre a chama do bico de gás por poucos segundos.
- Colocar a lâmina sobre o suporte para coloração, com o lado dos esfregaços voltado para cima.
- Cobrir os esfregaços com a solução de fucsina, recentemente filtrada. Deixar à temperatura ambiente durante 20 minutos.
- Lavar a lâmina com água corrente de baixa pressão, inclinando-a para remover o excesso.
- Gotejar a solução álcool-ácida delicadamente sobre a lâmina, até que esta fique limpa e o esfregaço com coloração rósea.
- Lavar com água corrente de baixa pressão e inclinar a lâmina para remover o excesso.
- Cobrir com a solução de azul de metileno durante 1 minuto.
- Lavar em água corrente de baixa pressão.
- Deixar secar à temperatura ambiente.
- Examinar ao microscópio com objetiva de imersão.

3.5 Microscopia

3.5.1 Equipamento e material

- Microscópio óptico, equipado com objetiva de imersão 100X e boa fonte de luz;
- Óleo de imersão;
- Papel higiênico.

3.5.2 Leitura do *M. leprae*

Iniciar com menor aumento (10X e a seguir 40X) para avaliar o aspecto geral do esfregaço. Este deve ter tonalidade azul e os BAAR devem ser finos, pequenos ou longos, curvos, de cor vermelha; depósitos avermelhados na preparação indicam esfregaços mal feitos ou descoloração inadequada.

Passar para imersão (100X). Cada esfregaço contém cerca de 1600 a 2600 campos de visão à objetiva de imersão (SERUFO et al., 2007b). A leitura deve ser feita no mínimo em 100 campos microscópicos, o que corresponde à leitura de uma linha reta que vai do extremo, onde está a numeração, até o extremo oposto, aproximadamente.

Os bacilos observados em cada campo microscópico são contados, incluindo aqueles isolados, agrupados e as globias. O número de bacilos encontrados em cada campo é anotado. Após a análise do esfregaço, somam-se estes números, dividindo-se pelo número de campos microscópicos examinados. Essa média de número de bacilos será o índice baciloscópico (IB) do esfregaço. O IB do paciente será a média dos índices dos esfregaços.

O resultado é expresso conforme a escala logarítmica de Ridley, variando de 0 a 6+ (RIDLEY; JOPLING, 1966).

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Dermatologia Sanitária. **Normas técnicas e procedimentos para o exame baciloscópico em hanseníase**. Brasília, DF, 1989.

RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. **Int. J. Lepr.**, v.34, p.255-73. 1966.

SERUFO, J.C.; REIS, C.M.F.; SANTOS, S.G. **POP Micra: Pesquisa de BAAR**. Técnica de Ziehl-Neelsen. ISO 9002-2007, versão 01, 2007b.

APÊNDICE D

TÉCNICA DA AURAMINA O

1. PRINCÍPIO

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 excitada 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.

2. APLICAÇÃO CLÍNICA

Diagnóstico presuntivo das infecções causadas por micobactérias.

3. REAGENTES E INSUMOS

3.1 Material

- Lâmina e lamínula
- Álcool 70%
- Pinça anatômica
- Suporte para coloração
- Água corrente
- Potes de 100ml, de tampa rosqueável

3.2 Bateria de corantes

3.2.1 Solução de Auramina fenicada a 0,01%

Auramina O	-----	0,1g
Álcool etílico a 95%	-----	10ml

Dissolver 0,1g de Auramina O em 10ml de álcool. Juntar 90ml de fenol aquoso. Agitar. Guardar em frasco escuro na geladeira, pois a Auramina é inativada pelo calor. Evitar o contato com a pele, pois tem poder cancerígeno.

3.2.2 Solução de fenol aquoso

Fenol cristalizado	-----	3g
Água destilada	-----	87ml

Aquecer em banho-maria até a completa dissolução. Deixar esfriar.

3.2.3 Solução de permanganato de potássio a 0,5%

Permanganato de potássio	-----	0,5g
Água destilada	-----	100ml

Dissolver o permanganato de potássio na água destilada. Estocar em frasco escuro.

3.2.4 Solução descorante

Ácido clorídrico PA	-----	0,5ml
Álcool etílico a 70%	-----	100ml

Com uma pipeta, deixar escorrer o ácido clorídrico pelas paredes do frasco contendo o álcool e agitar suavemente.

3.3 Recomendações gerais

A validade das soluções de trabalho é de 1 ano à temperatura ambiente e devem ser guardadas em frasco âmbar..

3.4 Técnica de coloração – Auramina O

- Se não houver certeza de que a lâmina foi fixada, passar vagarosamente sobre a chama do bico de gás por poucos segundos.
- Colocar a lâmina sobre o suporte para coloração com o lado dos esfregaços voltado para cima.
- Cobrir os esfregaços com a solução de Auramina O fenicada.
- Deixar à temperatura ambiente por 15 minutos.
- Lavar o esfregaço com água destilada de baixa pressão. Não usar água de torneira, pois o cloro pode interferir na fluorescência.
- Descorar com álcool-ácido (solução descorante) por 2 minutos.
- Lavar o esfregaço novamente.
- Cobrir o esfregaço com solução de permanganato de potássio por 2 minutos.
- Deixar secar à temperatura ambiente.
- Examinar ao microscópio fluorescente dentro de 24 horas.

3.5 Microscopia

3.5.1 Equipamento e material

- Microscópio óptico próprio para leitura de imunofluorescência.

3.5.2 Leitura do *M. leprae*

Ao microscópio de fluorescência, a luz proveniente de fonte rica em ultravioleta passa através de filtro que absorve todos, exceto os raios violeta e ultravioleta; estes são absorvidos por filtro amarelo na lente ocular, impedindo que

alcancem os olhos. Durante a passagem através do esfregaço, os raios ultravioleta atingem os bacilos corados pela Auramina que fluorescem em amarelo, contrastando com o fundo escuro (LIND, 1948).

Iniciar com menor aumento (10X e a seguir 40X) para avaliar o aspecto geral do esfregaço. As micobactérias emitem fluorescência amarelo-brilhante sobre fundo negro, apresentando-se como bastonetes delgados, ligeiramente curvos, isolados, aos pares ou em grupos. A fluorescência não específica é geralmente amarelo-pálida.

Passar para imersão (100X). Cada esfregaço contém cerca de 1600 a 2600 campos de visão à objetiva de imersão (SERUFO et al., 2007a). A leitura deve ser feita no mínimo em 100 campos microscópicos, o que corresponde à leitura de uma linha reta que vai do extremo, onde está a numeração, até o extremo oposto, aproximadamente.

Os bacilos observados em cada campo microscópico são contados, incluindo aqueles isolados, agrupados e as globias. O número de bacilos contados em cada campo é anotado. Após a análise do esfregaço, somam-se estes números, dividindo-se pelo número de campos microscópicos examinados. Essa média de número de bacilos será o índice baciloscópio (IB) do esfregaço. O IB do paciente será a média dos índices dos esfregaços.

O resultado é expresso conforme a escala logarítmica de Ridley, variando de 0 a 6+ (RIDLEY; JOPLING, 1966).

REFERÊNCIAS

COLLINS, H.M. et al. Microscopic counts carried out on *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* suspensions. A comparison of three staining procedures. **Int. J. Lepr.**, v.48, n.4, p.402-7, 1980.

LIND, H.E. Limitations of fluorescent microscopy for detection of acid-fast bacilli. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.19, p.72-5, 1949.

PRENDES, M.A.G. et al. La microscopia fluorescente em leprologia. Valoracion del método fluorescente frente al Ziehl-Neelsen em el diagnostico bacteriológico. **Int. J. Lepr.**, v.21, n.1, p.35-40, 1953.

RICHARDS, O.W.; MILLER, D.K. An efficient method for the identification of tuberculosis bacteria with a simple fluorescent microscope. **Am. J. Clin. Pathol. Tech.**, n.5 (supp.), p.1-8, 1941.

SERUFO, J.C.; REIS, C.M.F.; SANTOS, S.G. **POP Micra: Pesquisa de BAAR.** Método de coloração fluorescente – Auramina. ISO 9002-2007, versão 01, 2007a.

APÊNDICE E
ANÁLISE EXPLORATÓRIA

			Statistic	Std. Error	
Ziehl 4 sítios	Mean		,8977	,13866	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,6229		
		Upper Bound	1,1726		
	5% Trimmed Mean		,7626		
	Median		,0000		
	Variance		2,115		
	Std. Deviation		1,45431		
	Minimum		,00		
	Maximum		4,50		
	Range		4,50		
	Interquartile Range		1,69		
	Skewness		1,279	,230	
	Kurtosis		-,013	,457	
	Auramina 4 sítios	Mean		,9443	,14307
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,6608	
Upper Bound			1,2279		
5% Trimmed Mean			,8106		
Median			,0000		
Variance			2,252		
Std. Deviation			1,50053		
Minimum			,00		
Maximum			4,75		
Range			4,75		
Interquartile Range			2,00		
Skewness			1,223	,230	
Kurtosis			-,154	,457	

			Statistic	Std. Error	
Auramina 6 sítios	Mean		,8615	,13340	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,5971		
		Upper Bound	1,1259		
	5% Trimmed Mean		,7252		
	Median		,0000		
	Variance		1,958		
	Std. Deviation		1,39912		
	Minimum		,00		
	Maximum		4,50		
	Range		4,50		
	Interquartile Range		1,56		
	Skewness		1,323	,230	
	Kurtosis		,169	,457	
	Ziehl 6 sítios	Mean		,7982	,12534
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	,5498	
Upper Bound			1,0467		
5% Trimmed Mean			,6707		
Median			,0000		
Variance			1,728		
Std. Deviation			1,31460		
Minimum			,00		
Maximum			4,08		
Range			4,08		
Interquartile Range			1,42		
Skewness			1,357	,230	
Kurtosis			,222	,457	

Testes de Normalidade

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ziehl 4 sítios	,377	110	,000	,650	110	,000
Auramina 4 sítios	,381	110	,000	,659	110	,000
Auramina 6 sítios	,358	110	,000	,656	110	,000
Ziehl 4 sítios	,355	110	,000	,646	110	,000

APÊNDICE F

ANÁLISE DA CONFIABILIDADE INTEROBSERVADOR

- Média, desvio-padrão e confiabilidade interobservador da técnica de Ziehl-Neelsen em quatro sítios

	Mean	Std. Deviation	N
Ziehl4e1	,9523	1,53233	110
Ziehl4e2	,8432	1,40847	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation (a)		95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			Lower Bound
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig		
Single Measures	,951(b)	,927	,967	41,555	109	109	,000	
Average Measures	,975	,962	,983	41,555	109	109	,000	

Two-way random effects model where both people effects and measures effects are random.

a Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.

b The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

- Média, desvio-padrão e confiabilidade interobservador da técnica de Ziehl-Neelsen em seis sítios

	Mean	Std. Deviation	N
Ziehl6e1	,8366	1,35899	110
Ziehl6e2	,7598	1,29609	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation-a		95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			Lower Bound
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig		
Single Measures	,959(b)	,940	,972	49,125	109	109	,000	
Average Measures	,979	,969	,986	49,125	109	109	,000	

Two-way random effects model where both people effects and measures effects are random.

a Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.

b The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

- Média, desvio-padrão e confiabilidade interobservador da técnica da Auramina O em quatro sítios

	Mean	Std. Deviation	N
Aura4 e1	,9295	1,48198	110
Aura4 e2	,9591	1,53422	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation (a)		95% Confidence Interval		F Test with True Value 0		
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig	Lower Bound
Single Measures	,979(b)	,970	,986	96,090	109	109	,000
Average Measures	,990	,985	,993	96,090	109	109	,000

Two-way random effects model where both people effects and measures effects are random.

a Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.

b The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

- Média, desvio-padrão e confiabilidade interobservador da técnica da Auramina O em seis sítios

	Mean	Std. Deviation	N
Aura6e1	,8502	1,38095	110
Aura6e2	,8729	1,42600	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation(a)		95% Confidence Interval		F Test with True Value 0		
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig	Lower Bound
Single Measures	,987(b)	,981	,991	154,042	109	109	,000
Average Measures	,994	,991	,996	154,042	109	109	,000

Two-way random effects model where both people effects and measures effects are random.

a Type A intraclass correlation coefficients using an absolute agreement definition.

b The estimator is the same, whether the interaction effect is present or not.

APÊNDICE G
TESTES T PARA MEDIDAS ENTRE OBSERVADORES

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Ziehl4e1	,9523	110	1,53233	,14610
	Ziehl4e2	,8432	110	1,40847	,13429
Pair 2	Ziehl6e1	,8366	110	1,35899	,12957
	Ziehl6e2	,76	110	1,296	,124
Pair 3	Aura4e1	,9295	110	1,48198	,14130
	Aura4e2	,959	110	1,5342	,1463
Pair 4	Aura6e1	,8502	110	1,38095	,13167
	Aura6e2	,8729	110	1,42600	,13596

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Ziehl4e1 - Ziehl4e2	,10909	,45121	,04302	,02383 ,19436	2,536	109	,013
Pair 2	Ziehl6e1 - Ziehl6e2	,07682	,37512	,03577	,00593 ,14771	2,148	109	,034
Pair 3	Aura4e1 - Aura4e2	-,02955	,30615	,02919	-,08740 ,02831	-1,012	109	,314
Pair 4	Aura6e1 - Aura6e2	-,02273	,22546	,02150	-,06533 ,01988	-1,057	109	,293

APÊNDICE H
CONCORDÂNCIA E ASSOCIAÇÃO ENTRE ZIEHL-NEELSEN E AURAMINA E
ENTRE SÍTIOS DIFERENTES – ANÁLISE QUALITATIVA

- Concordância entre Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro sítios – Kappa

	Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	,921	,039	9,655	,000
N of Valid Cases	110			

a Not assuming the null hypothesis.

b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

- Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro sítios – Teste McNemar

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test				1,000
N of Valid Cases	110			

- Concordância entre Ziehl-Neelsen e Auramina em seis sítios – Kappa

	Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement Kappa	,883	,046	9,265	,000
N of Valid Cases	110			

a Not assuming the null hypothesis.

b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

- Ziehl-Neelsen e Auramina em seis sítios – Teste McNemar

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test				1,000
N of Valid Cases	110			

- Concordância da técnica de Ziehl-Neelsen entre quatro e seis sítios – Kappa

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,961	,027	10,084	,000
N of Valid Cases		110			

a Not assuming the null hypothesis.

b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis

- Ziehl-Neelsen entre quatro e seis sítios – Teste McNemar

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test				,500
N of Valid Cases		110		

- Concordância da técnica da Auramina entre quatro e seis sítios – Kappa

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,961	,027	10,084	,000
N of Valid Cases		110			

a Not assuming the null hypothesis.

b Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

- Auramina entre quatro e seis sítios – Teste McNemar

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)
McNemar Test				,500(a)
N of Valid Cases		110		

APÊNDICE I
CONFIABILIDADE ENTRE ZIEHL-NEELSEN E AURAMINA O E ENTRE SÍTIOS
DIFERENTES – ANÁLISE QUANTITATIVA

- Confiabilidade entre Ziehl-Neelsen e Auramina em quatro sítios

Item Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
Ziehl 4 sítios	,8977	1,45431	110
Auramina 4 sítios	,9443	1,50053	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation		95% Confidence Interval		F Test with True Value 0		
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig	Lower Bound
Single Measures	,986	,980	,990	146,257	109	109	,000
Average Measures	,993	,990	,995	146,257	109	109	,000

- Confiabilidade entre Ziehl-Neelsen e Auramina em seis sítios

Item Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
Auramina 6 sítios	,8615	1,39912	110
Ziehl 6 sítios	,7982	1,31460	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation		95% Confidence Interval		F Test with True Value 0		
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig	Lower Bound
Single Measures	,986(b)	,978	,990	148,539	109	109	,000
Average Measures	,993	,989	,995	148,539	109	109	,000

- Confiabilidade da técnica de Ziehl-Neelsen entre quatro e seis sítios

Item Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
Ziehl 4 sítios	,8977	1,45431	110
Ziehl 6 sítios	,7982	1,31460	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig	Lower Bound
Single Measures	,984(b)	,971	,991	150,718	109	109	,000
Average Measures	,992	,985	,995	150,718	109	109	,000

- Confiabilidade da técnica da Auramina entre quatro e seis sítios

Item Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
Auramina 4 sítios	,9443	1,50053	110
Auramina 6 sítios	,8615	1,39912	110

Intraclass Correlation Coefficient

	Intraclass Correlation	95% Confidence Interval		F Test with True Value 0			
	Lower Bound	Upper Bound	Value	df1	df2	Sig	Lower Bound
Single Measures	,988(b)	,979	,993	189,993	109	109	,000
Average Measures	,994	,990	,996	189,993	109	109	,000

APÊNDICE J
TESTES T PARA MEDIDAS ENTRE EXAMES BACILOSCÓPICOS

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	Ziehl 4 sítios	,8977	110	1,45431	,13866
	Aura 4 sítios	,9443	110	1,50053	,14307
Pair 2	Aura 6 sítios	,8615	110	1,39912	,13340
	Ziehl 6 sítios	,7982	110	1,31460	,12534
Pair 3	Aura 4 sítios	,9443	110	1,50053	,14307
	Aura 6 sítios	,8615	110	1,39912	,13340
Pair 4	Ziehl 4 sítios	,8977	110	1,45431	,13866
	Ziehl 6 sítios	,7982	110	1,31460	,12534

Paired Samples Test

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference			
Pair 1	Ziehl 4 sítios - Aura 4 sítios	-,04659	,24353	,02322	-,09261 - ,00057	-2,007	109	,047
	Aura 6 sítios - Ziehl 6 sítios	,06332	,22202	,02117	,02136 - ,10527	2,991	109	,003
Pair 3	Aura 4 sítios - Aura 6 sítios	,08277	,20994	,02002	,04310 - ,12245	4,135	109	,000
	Ziehl 4 sítios - Ziehl 6 sítios	,09950	,22508	,02146	,05697 - ,14203	4,636	109	,000

APÊNDICE K
CONCORDÂNCIA ENTRE A BACILOSCOPIA PELAS TÉCNICAS DE ZIEHL-NEELSEN E AURAMINA E A CLASSIFICAÇÃO OPERACIONAL

- Concordância entre Ziehl-Neelsen em quatro sítios e a classificação operacional

		Value	Asymp. Std. Error	Approx. T	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,591	,076	6,362	,000
N of Valid Cases		110			

- Concordância entre Ziehl-Neelsen em seis sítios e a classificação operacional

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,592	,076	6,323	,000
N of Valid Cases		110			

- Concordância entre Auramina em quatro sítios e a classificação operacional

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,517	,080	5,563	,000
N of Valid Cases		110			

- Concordância entre Auramina em seis sítios e a classificação operacional

		Value	Asymp. Std. Error(a)	Approx. T(b)	Approx. Sig.
Measure of Agreement	Kappa	,518	,081	5,532	,000
N of Valid Cases		110			

APÊNDICE L
TESTE QUI QUADRADO DA RELAÇÃO ENTRE BACILOSCOPIA E
CLASSIFICAÇÃO DE MADRID

- Ziehl-Neelsen em quatro sítios e classificação de Madrid

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	41,693(a)	3	,000
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	51,592	3	,000
Linear-by-Linear Association	30,658	1	,000
N of Valid Cases	110		

- Ziehl-Neelsen em seis sítios e classificação de Madrid

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	39,765(a)	3	,000
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	50,491	3	,000
Linear-by-Linear Association	30,351	1	,000
N of Valid Cases	110		

- Auramina em quatro sítios e classificação de Madrid

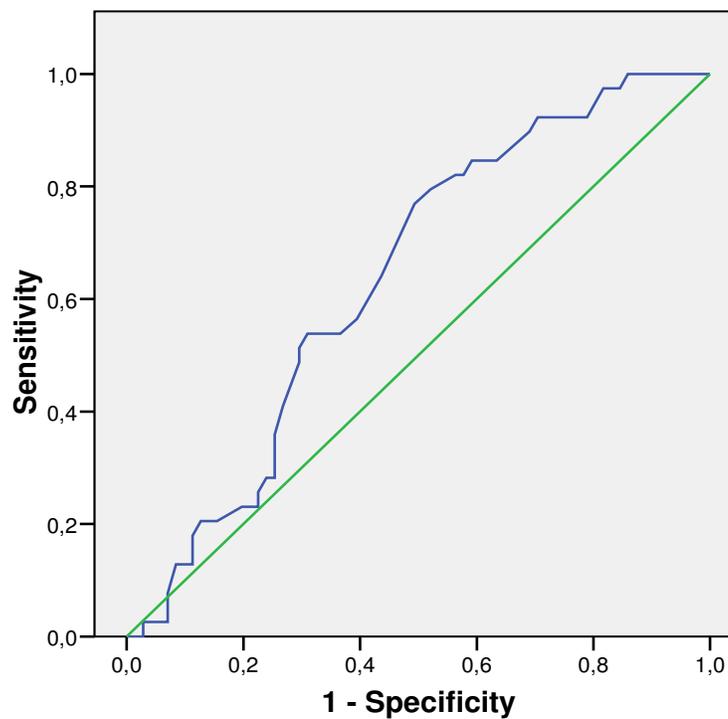
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	41,693(a)	3	,000
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	51,592	3	,000
Linear-by-Linear Association	30,658	1	,000
N of Valid Cases	110		

- Auramina em seis sítios e classificação de Madrid

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	37,833(a)	3	,000
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	46,692	3	,000
Linear-by-Linear Association	24,368	1	,000
N of Valid Cases	110		

APÊNDICE M CURVA ROC

ROC Curve



Diagonal segments are produced by ties.

Area Under the Curve

Test Result Variable(s): idade

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig. ^b	Asymptotic 95% Confidence Interval	
			Lower Bound	Upper Bound
,639	,053	,016	,535	,742

The test result variable(s): idade has at least one tie between the positive actual state group and the negative actual state group. Statistics may be biased.

- a. Under the nonparametric assumption
- b. Null hypothesis: true area = 0.5

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): idade

Positive if Less Than or Equal To(a)	Sensitivity	1 - Specificity
9,00	,000	,000
10,50	,000	,014
15,00	,000	,028
19,50	,026	,028
21,50	,026	,042
23,50	,026	,056
24,50	,026	,070
25,50	,077	,070
26,50	,128	,085
27,50	,128	,113
28,50	,179	,113
29,50	,205	,127
31,50	,205	,155
33,50	,231	,197
34,50	,231	,225
35,50	,256	,225
36,50	,282	,239
37,50	,282	,254
38,50	,359	,254
39,50	,410	,268
40,50	,487	,296
41,50	,513	,296
42,50	,538	,310
44,00	,538	,338
45,50	,538	,366
46,50	,564	,394
47,50	,641	,437
48,50	,769	,493
49,50	,795	,521
51,00	,821	,563
52,50	,821	,577
53,50	,846	,592
54,50	,846	,634
55,50	,872	,662
56,50	,897	,690
58,00	,923	,704
59,50	,923	,775
61,00	,923	,789
63,00	,974	,817
64,50	,974	,831
65,50	,974	,845
67,00	1,000	,859
69,00	1,000	,873
71,50	1,000	,887
74,00	1,000	,901
75,50	1,000	,915
76,50	1,000	,930
77,50	1,000	,944
78,50	1,000	,986
80,00	1,000	1,000

APÊNDICE N

REGRESSÃO LOGÍSTICA

Hosmer and Lemeshow Test

Step	Chi-square	df	Sig.
1	2,589	7	,920

Variables in the Equation

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)	95,0% C.I. for EXP(B)	
		Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper	Lower	Upper
Step1	Sexo masculino	,556	,570	,954	1	,329	1,744	,571	5,327
	Idade ≤ 42a	,903	,544	2,760	1	,097	2,467	,850	7,161
	> 5 lesões	2,959	,583	25,753	1	,000	19,285	6,150	60,479
	> 1 nervo	1,255	,547	5,257	1	,022	3,508	1,200	10,254
	Constante	-3,583	,717	24,994	1	,000	,028		

Correlation Matrix

		Constante	Sexo masculino	Idade ≤ 42a	> 5 lesões	> 1 nervo
Step 1	Constante	1,000	-,496	-,379	-,618	-,397
	Sexo masculino	-,496	1,000	-,023	-,022	-,062
	Idade ≤ 42a	-,379	-,023	1,000	,074	,099
	> 5 lesões	-,618	-,022	,074	1,000	,135
	> 1 nervo	-,397	-,062	,099	,135	1,000

ANEXOS

ANEXO A	- PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DO HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES.....	129
ANEXO B	- PARECER N. ETIC 0428/06 – COEP/UFMG.....	130

ANEXO A
PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA DO
HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

HOSPITAL EDUARDO DE MENEZES

FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DECLARAÇÃO

Declaro que o Projeto de Pesquisa "Estudo Comparativo da Baciloscopia do Raspado Dérmico para Detecção do *Mycobacterium leprae* pelas Técnicas de Ziehl-Neelsen e Fluorescência pela Auramina-O em Casos Novos de Hanseníase", da pesquisadora Dra. Juliana Cunha Sarubi, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes, na reunião do dia 19 de abril de 2006.

Belo Horizonte, 25 de maio de 2006


Dr. Jader Bernardo Campomizzi
Coordenador do CEP/HEM

ANEXO B
PARECER N. ETIC 0428/06 – COEP/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 0428/06

Interessado: Profa. Juliana Cunha Sarubi
Depto de Clínica Médica
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 13 de dezembro de 2006, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo comparativo da baciloscopia do raspado dérmico para detecção do *Mycobacterium leprae* pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e fluorescência pela Auramina-O em casos novos de hanseníase."** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

PARECER DO PROJETO FR-428/06

TÍTULO: Estudo comparativo da baciloscopia do raspado dérmico para detecção do *Micobacterium leprae* pelas técnicas de Ziehl Neelsen e fluorescência pela Auramina-O em casos novos de hanseníase.

INTERESSADO:

- 1 JOSÉ CARLOS SERUFO - Professor Doutor do Departamento Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG. Tel: 32489820 jcserufo@ieg.com.br
- 2 JULIANA CUNHA SARUBI-Mestranda em Infectologia e Medicina Tropical. Tel. 3227-2572- jsarubi@bol.com.br

DOCUMENTOS:

Este projeto foi aprovado pela Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da UFMG em 15 de setembro de 2006 e no Departamento de Clínica Médica em 10 de outubro de 2006 com parecer consubstanciado.

Protocolado no COEP em 08/11/2006 e encaminhado ao parecerista em 08/11/2006.

Folha de Rosto com as assinaturas do pesquisador responsável e do responsável institucional (Diretor de Faculdade de Medicina da UFMG)

Anexado ao protocolo declaração de que o referido projeto foi aprovado no COEP do Hospital Eduardo de Menezes (HEM) e termo de acordo da realização do trabalho assinado pelo diretor daquela instituição.

Curriculum Vitae do pesquisador na plataforma Lattes.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO: De acordo com a Res.196/96.

OBJETIVOS DO ESTUDO: Verificar o melhor método de exame de baciloscopia em pacientes com hanseníase.

DESENVOLVIMENTO: Trata-se de um estudo que deverá ser realizado após aprovação pelos COEPs da UFMG e HEM; comparando-se o raspado dérmico de pacientes atendidos no Hospital Eduardo de Menezes durante 01 ano. O material analisado é habitualmente colhido em todos os pacientes com hanseníase.

Continuação do PARECER DO PROJETO FR-428/06

RISCOS: Os riscos para os participantes do estudo são aqueles relacionados com a confidencialidade dos dados. Pesquisadores se comprometem a cumprir os termos da Resolução 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde.

PARECER FINAL:

- 1 Somos pela aprovação do projeto como apresentado.