

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANTICORPO POLICLONAL ANTI-BCG NO DIAGNÓSTICO DOS**  
**GRANULOMAS IMUNOLÓGICOS CUTÂNEOS**

Autora: Letícia Krause Schenato

Orientador: Prof. Dr. Lucio Bakos

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Porto Alegre, janeiro de 2009.**

S324a **Schenato, Leticia Krause**

Anticorpo policlonal anti-BCG no diagnóstico dos granulomas imunológicos cutâneos / Leticia Krause Schenato ; orient. Lucio Bakos. – 2009.  
63 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Granuloma 2. Diagnóstico 3. Anticorpos antibacterianos 4. Imunoistoquímica 5. Pele I. Bakos, Lucio  
II. Título.

NLM: QZ 140

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre priorizaram os meus estudos e me incentivaram no árduo caminho do crescimento profissional.

À minha mãe Lilian e ao meu pai Remy, o meu eterno agradecimento por todos os esforços realizados em meu benefício e pelo amor incondicional! Eu não teria chegado ao Mestrado sem a ajuda de vocês, muito obrigada por tudo!

Este trabalho e todas as minhas vitórias são também de vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Lucio Bakos, por ter me conduzido de forma tão especial neste estudo e pelo incentivo no início de minha vida acadêmica. É uma honra tê-lo como meu Orientador! Sua incessante curiosidade científica e ensinamentos ficarão para sempre em minha memória, muito obrigada!

Ao Prof. André Cartell, por sua extrema dedicação em me auxiliar no entendimento da Patologia. Pela leitura das lâminas, idéias brilhantes e companheirismo. André, sem ti este trabalho não existiria!

À Dra. Carla Pagliari, bióloga responsável pelo Setor de Imunoistoquímica do Laboratório de Patologia de Moléstias Transmissíveis da Faculdade de Medicina da USP, mesmo sem me conhecer pessoalmente, por ter demonstrado sempre muita atenção às minhas dúvidas, me respondendo com paciência e entusiasmo inúmeros e-mails, e por gentilmente ter nos cedido as alíquotas do anticorpo anti-BCG, sem as quais este estudo não teria sido realizado. Dra. Carla, terás minha eterna gratidão!

À Sra. Neiva Copetti, por ter feito com muita dedicação todas as lâminas de imunoistoquímica. Dona Neiva, és muito especial para mim!

Ao Prof. Dr. Antonio Pedro Mendes Schettini, pesquisador do CNPq e da Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta, pela dedicação de toda sua vida ao estudo da hanseníase e por ter disponibilizado parte do seu precioso tempo em me auxiliar na estruturação do projeto, sem nem me conhecer pessoalmente. Dr. Schettini, serás sempre um exemplo de médico para mim!

Aos residentes dos Serviços de Dermatologia e de Patologia do HCPA, em especial ao médico residente da Patologia, Dennis Baroni Cruz, pelas excelentes fotografias do artigo.

Aos funcionários dos Serviços de Dermatologia e de Patologia do HCPA, em especial à senhora Zeli, pela separação dos blocos de parafina, e à secretária Bernardete, sempre muito atenciosa.

Ao FIPE-HCPA, pelo auxílio financeiro na confecção das lâminas de imunoistoquímica.

Ao prof. Timothy Donovan, muito ágil e competente na tradução do artigo.

Às alunas da ULBRA, Roberta, Mariana e Júlia, pelas inúmeras ajudas.

Às colegas de docência, Dra. Ana Paula Dornelles Manzoni e Dra. Vanessa Santos Cunha, agradeço pelos inúmeros conselhos.

Aos demais colegas Dermatologistas, em especial ao amigo-irmão Dr. Vinicius Torres Richter, companheiro querido de todos os momentos.

Ao meu namorado Rafael, pelo apoio e carinho tão importantes nos últimos meses.

À minha mãe Lilian, sempre muito estudiosa e de espírito curioso, me fez ter um gosto especial pelo conhecimento e esteve incansavelmente ao meu lado, me ajudando nas mais diversas tarefas. Mãezona, muito obrigada!

Ao meu pai Remy, que sempre trabalhou com afinco para que eu tivesse o melhor e que me levou de um lado para o outro, para que eu pudesse cumprir com todos os meus compromissos. Paizinho, muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO</b>	<b>6</b>
<b>2. LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>3. LISTA DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>4. LISTA DE TABELAS</b>	<b>12</b>
<b>5. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>6. REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>15</b>
<b>6.1. Granulomas cutâneos</b>	<b>16</b>
<b>6.1.1. Granulomas cutâneos infecciosos</b>	<b>17</b>
<b>6.1.2. Granulomas cutâneos não-infecciosos</b>	<b>18</b>
<b>6.2. Métodos laboratoriais diagnósticos das doenças cutâneas granulomatosas infecciosas</b>	<b>20</b>
<b>6.2.1. Hanseníase</b>	<b>20</b>
<b>6.2.2. Tuberculose e micobacterioses atípicas</b>	<b>22</b>
<b>6.2.3. Esporotricose</b>	<b>24</b>
<b>6.2.4. Cromomicose</b>	<b>25</b>
<b>6.3. Anticorpo policlonal anti-BCG</b>	<b>27</b>
<b>6.3.1. Informações gerais</b>	<b>27</b>
<b>6.3.2. Uso do anti-BCG na hanseníase</b>	<b>28</b>
<b>6.3.3. Uso do anti-BCG em outras doenças cutâneas</b>	<b>29</b>
<b>7. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>32</b>
<b>9. ARTIGO EM INGLÊS</b>	<b>39</b>
<b>10. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	<b>63</b>

## 1. RESUMO

**Introdução:** O emprego de técnicas de interpretação imunológica de agentes infecciosos, de uma maneira geral, confere maior sensibilidade e especificidade ao exame histopatológico; o anticorpo policlonal anti-BCG tem sido testado como uma coloração imunoistoquímica de triagem para espécimes de biópsias cutâneas, com suspeita de origem infecciosa; em casos de infecções fúngicas e bacterianas, os resultados mostraram-se claramente superiores aos conseguidos pelas técnicas histoquímicas convencionais.

**Objetivos:** Verificar a positividade da reação imunoistoquímica com o anti-BCG em granulomas imunológicos cutâneos, que não puderam ter o seu diagnóstico etiológico definido pelos métodos histoquímicos usuais de coloração para agentes infecciosos (Grocott e Ziehl-Neelsen) e também descrever a sensibilidade e especificidade deste anticorpo, através da comparação com os exames culturais para fungos e micobactérias.

**Metodologia:** Procedeu-se à técnica imunoistoquímica com o anti-BCG em 33 biópsias cutâneas com granulomas imunológicos, com colorações de Grocott e Ziehl-Neelsen negativas. Também foram selecionados 13 casos de hanseníase virchowiana e 11 de granulomas por degeneração do colágeno, para que servissem de controles positivos e negativos, respectivamente. A leitura das lâminas foi realizada por dermatopatologista do HCPA que não tinha conhecimento dos dados clínicos dos pacientes. Não foi realizada a quantificação do antígeno nos cortes.

**Resultados:** Dos 33 casos estudados, 13 (39,4%) apresentaram imunoistoquímica positiva com o anti-BCG, os diagnósticos finais foram: 4

casos (12,12%) de tuberculose, 4 casos de esporotricose, 1 caso (3.03%) de cromomicose, 1 caso de hanseníase tuberculóide e 3 casos (9.09%) que não puderam ter o diagnóstico conhecido, pois perderam o acompanhamento médico. A sensibilidade do anti-BCG quando comparado com a cultura para fungos foi de 57,1% e a especificidade de 66,7%; na comparação com a cultura para micobactérias a sensibilidade foi de 100%, porém só haviam 2 exames positivos, e a especificidade foi de 67,7%. Nos casos de hanseníase virchowiana, a sensibilidade e a especificidade foi de 100%.

**Conclusão:** A técnica imunoistoquímica com o anticorpo anti-BCG é relativamente fácil, rápida e de baixo custo e mostrou ser útil na identificação de microorganismos que não foram prontamente visualizados com as colorações de Grocott e Ziehl-Neelsen. Entretanto, o pequeno número de controles pode ter influenciado no desempenho do método.



## 2. LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

AFB – Acid-fast bacilli (Bacilos álcool-ácido resistentes)

BAAR – Bacilos álcool-ácido resistentes

BCG – Bacilo de Calmette Guérin

BH - Bacilo de Hansen (*Mycobacterium leprae*)

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

H&E – Hematoxilina e Eosina

PAS – Ácido periódico de Schiff

PCR – Polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)

### 3. LISTA DE FIGURAS

#### REVISÃO DA LITERATURA:

**Figura 1:** Células gigantes multinucleadas de uma reação granulomatosa (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).....**15**

**Figura 2:** Característico aspecto histopatológico granulomatoso da sarcoidose. (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).....**18**

**Figura 3:** Granuloma necrobiótico (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).....**19**

**Figura 4:** Numerosos bacilos dentro da célula gigante (400x). (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).....**21**

**Figura 5:** Corpos fumagóides na cromomicose (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).....**26**

## ARTIGO EM INGLÊS

**Figure 1:** Coccoid structures, stained brown, inside the macrophages (arrow), labeled with anti-BCG. Diagnosis of mycobacteriosis by positive culture for *Mycobacterium sp.* (Immersion, 1.000x).....**58**

**Figure 2:** Minute brown cigar-shaped structure (arrow) labeled with anti-BCG. Diagnosis of sporothricosis by positive culture for *Sporothrix schenckii.* (Immersion, 1.000x).....**59**

**Figure 3:** Chromomycosis fumagoid bodies (arrows) labeled with anti-BCG. Diagnosis obtained using immunohistochemistry, as in this case there was a negative direct smear for fungi and negative fungal cultures. (Immersion, 1.000x).....**59**

**Figure 4:** Lepromatous leprosy: comparison between Ziehl-Neelsen staining (photos on the right) and immunohistochemistry with anti-BCG (photos on the left), in the erector pili muscle (Immersion, 1.000x).....**60**

**Figure 5:** Lepromatous leprosy: comparative photographs of the same areas, from top to bottom, with increasing magnification of 40x (A and D), 100x (B and E) and 400x (C and F); anti-BCG on the left and Ziehl-Neelsen staining on the right.....**61**

**Figure 6:** Lepromatous leprosy: comparative photographs of the same areas, from top to bottom, with increasing magnification of 40x (A and D), 100x (B and E) and 400x (C and F); the photos on the left show labeling with anti-BCG and those on the right, Ziehl-Neelsen staining.....**62**

## 4. LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

**TABELA 1:** Diagnóstico diferencial das infecções micobacterianas.....**17**

### ARTIGO EM INGLÊS

**TABLE 1** – Diagnostic performance of the anti-BCG against three standard references (fungi culture, mycobacteria culture and laboratory controls) in cases of immune-mediated cutaneous granuloma.....**58**

## 5. INTRODUÇÃO

Na rotina do diagnóstico em dermatopatologia, há uma demanda crescente por métodos rápidos, simples, custo-efetivos e de alta sensibilidade para serem utilizados como triagem na detecção de microorganismos<sup>(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11)</sup>. Tradicionalmente, os agentes infecciosos são detectados por procedimentos microbiológicos de pesquisa direta, cultura ou através de reações sorológicas e, mais recentemente, por técnicas de biologia molecular<sup>(3,7,8,10,12,13,14,15,16,17)</sup>. As técnicas imuno-histoquímicas são procedimentos de grande importância em patologia de doenças infecciosas e têm particular interesse no diagnóstico diferencial das lesões granulomatosas cutâneas<sup>(1,2,5,7,18,19,20)</sup>.

A literatura aponta que o emprego da imuno-histoquímica com o anticorpo anti-BCG permite a elucidação de muitos casos onde o agente etiológico não pode ser identificado pelas colorações histoquímicas usuais<sup>(1,2,4,14,18,21,22)</sup>. Este anticorpo marca uma ampla variedade de fungos e bactérias com alta sensibilidade e mínima coloração de *background*; estruturas normais da pele, debris celulares e material necrótico não são marcados, ao contrário do que ocorre com as colorações histoquímicas<sup>(1,2,5,6,7,14,23)</sup>. Infelizmente, por ser policlonal, ele não permite a identificação do tipo específico de micobactéria, sendo frequente a ocorrência de reações cruzadas<sup>(21,24,25,26)</sup>.

Kutzner et al<sup>(1)</sup>, em um estudo com 254 espécimes de lesões cutâneas de etiologias infecciosas variadas, verificou que o anti-BCG apresentava uma sensibilidade superior às colorações histoquímicas convencionais usadas no diagnóstico de bactérias e fungos; estes autores também confirmaram o fato de o anti-BCG não marcar *Leishmania*, vírus e *Treponema*<sup>(1,2,5,7,8,18)</sup>.

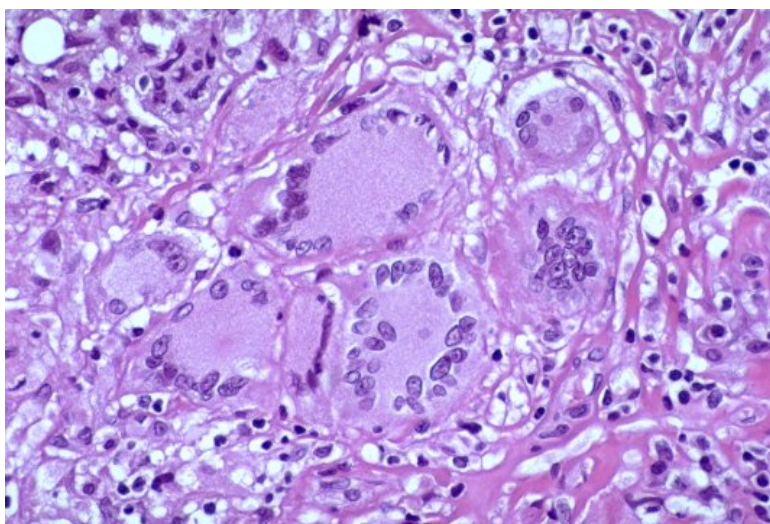
Vários autores<sup>(4,14,21,22,23,27,28)</sup> estudaram a utilização do anti-BCG como um método para aumentar a sensibilidade do diagnóstico da hanseníase paucibacilar, pois nestes casos é difícil encontrar os bacilos em espécimes de pele utilizando as colorações convencionais. Schettini et al<sup>(4)</sup> em um estudo com 51 casos suspeitos de hanseníase, 9 deles (17,6%) foram confirmados pelo H&E e/ou Wade, enquanto que utilizando o anticorpo anti-BCG foi possível fazer o diagnóstico em 24 casos (47,1%). Também Takahashi et al<sup>(29)</sup> estudou o uso do anti-BCG em pacientes com suspeita de hanseníase na forma indeterminada, o exame rotineiro para a detecção dos BAAR revelou uma positividade de 20%, enquanto com a imuno-histoquímica foi possível detectar a presença do antígeno em 67% dos casos.

Este estudo foi proposto com a finalidade de conhecermos se a técnica imuno-histoquímica com o anti-BCG é capaz de auxiliar no diagnóstico das lesões granulomatosas cutâneas. Avaliamos a sensibilidade e a especificidade da reação imuno-histoquímica com anticorpo policlonal anti-BCG em granulomas imunológicos cutâneos, que não puderam ter o diagnóstico etiológico definido pelos métodos histoquímicos usuais de coloração para agentes infecciosos, comparando com os exames culturais para fungos e micobactérias.

## 6. REVISÃO DA LITERATURA

### 6.1. Granulomas cutâneos

A reação granulomatosa é um tipo de inflamação crônica que se desenvolve em resposta a antígenos ou partículas que são difíceis de serem eliminadas, porque são insolúveis, pouco solúveis ou têm dificuldade de desintegrarem-se; o tecido inflamatório contém agregados bem circunscritos de células inflamatórias, que são os granulomas<sup>(10,20,30)</sup>. O termo granuloma pode ser definido, em termos histopatológicos, como uma hiperplasia focal, avascular, do sistema mononuclear macrofágico, como resposta a agentes agressores de baixa virulência<sup>(11,31)</sup>. Os granulomas são compostos fundamentalmente por macrófagos ou pela fusão deles, as chamadas células gigantes multinucleadas (Figura 1), podendo ou não estar acompanhados de necrose<sup>(10,11,20,32)</sup>.



**Figura 1:** Células gigantes multinucleadas de uma reação granulomatosa (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD)



Os granulomas com necrose são característicos das doenças infecciosas, como a tuberculose e as infecções fúngicas<sup>(10,12,32,33)</sup>. Necrose, usualmente mínima e focal, também pode ser vista nos granulomas da sarcoidose<sup>(10,30,34,35)</sup>. O uso dos termos “caseoso” e “não-caseoso” para descrever a aparência microscópica dos granulomas, embora comum de ser vista em livros, é inapropriada, uma vez que o termo “caseoso” somente se aplica à aparência semelhante ao queijo vista a olho nu, e pode estar também presente em neoplasias necrotizantes e outros tipos de lesões necróticas<sup>(10,31)</sup>. Por outro lado, os granulomas sem necrose são característicos da sarcoidose, beriliose, penumonite por hipersensibilidade, reações a drogas e hanseníase tuberculoide; a presença de um granuloma não-necrotizante geralmente é indicativa de uma etiologia não-infecciosa, embora uma infecção, como a tuberculose, não possa ser totalmente excluída<sup>(10,20,31,35)</sup>.

Existem diversas classificações para os granulomas utilizando critérios anatômicos e morfológicos, de etiologia ou de patogenia. Assim, os granulomas podem ser focais ou difusos (dependendo da sua distribuição pelos limites da agressão), simples ou compostos (quando apresentam somente macrófagos ou também células gigantes), imunológicos (também chamados de imunitários) ou não-imunológicos (de acordo com a capacidade ou não de induzir imunidade celular e pelo padrão de manter a estrutura granulomatosa a partir dos elementos da defesa imune), supurativos ou não-supurativos<sup>(10,11,20,30,31)</sup>.

### 6.1.1. Granulomas cutâneos infecciosos

O diagnóstico das doenças granulomatosas infecciosas depende de achados histológicos característicos (Tabela 1) e de um número suficiente de organismos do agente infeccioso para que ele possa ser detectado por técnicas histoquímicas<sup>(10,31,36,37)</sup>. Assim, a presença de granulomas epitelioides compactos, com necrose central e denso infiltrado linfocitário na periferia indicará um caso de tuberculose; um granuloma com envolvimento dos filetes nervosos sugere tratar-se de hanseníase tuberculoide. Uma inflamação mista granulomatosa e supurativa, com linfócitos, plasmócitos e ocasionalmente eosinófilos, é classicamente vista nas micoses subcutâneas e profundas. Entretanto, os padrões clássicos nem sempre estão presentes e podem ser alterados por uma resposta do indivíduo como uma imunossupressão ou uma hipersensibilidade a um agente específico<sup>(10,11,30,32,36)</sup>.

**Tabela 1:** Diagnóstico diferencial das infecções micobacterianas<sup>(32)</sup>

PADRÃO HISTOLÓGICO	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
Granuloma tuberculoide bem desenvolvido, sem necrose	Sarcoidose
Granuloma tuberculoide bem desenvolvido, com necrose	Lupus miliar disseminado da face
Granulomas “nus” com escassa necrose fibrinóide	Sarcoidose, hanseníase
Granulomas com extensa necrose fibrinóide	Nódulo reumatóide
Infiltrados difusos de histiócitos com poucas ou nenhuma célula epitelióide	Hanseníase, sífilis, acrodermatite crônica atrofiante
Inflamação crônica com células epitelioides dispersas e células gigantes sem a tendência de agruparem-se.	Sífilis, acrodermatite crônica atrofiante, infecções fúngicas

### 6.1.2. Granulomas cutâneos não-infecciosos

As doenças granulomatosas não-infecciosas compreendem um grupo de doenças representadas, ao exame histopatológico, por granulomas sem a participação etiopatogênica dos agentes infecciosos; neste contexto, o granuloma representa uma resposta do hospedeiro formada, sobretudo, por histiócitos. Os granulomas não-infecciosos podem ser divididos em: sarcoídicos, necrobióticos e de corpo estranho<sup>(10,30,31,32)</sup>.

- Granulomas sarcoídicos: o protótipo deste grupo é a sarcoidose, a queilite granulomatosa de Miescher é outro exemplo. O granuloma sarcoídico é um granuloma imunológico, constituído pelo arranjo concêntrico de células epitelióides. Em sua periferia, eles podem apresentar um halo frouxo de linfócitos, sendo por tal motivo designados “granulomas nus”, contrapondo-se aos granulomas tuberculoides, nos quais um denso infiltrado linfocitário pode ser observado no contorno. O granuloma sarcoídico pode apresentar-se envolvido por fibras de colágeno de arranjo compacto<sup>(11,31,34,35)</sup> (Figura 2).

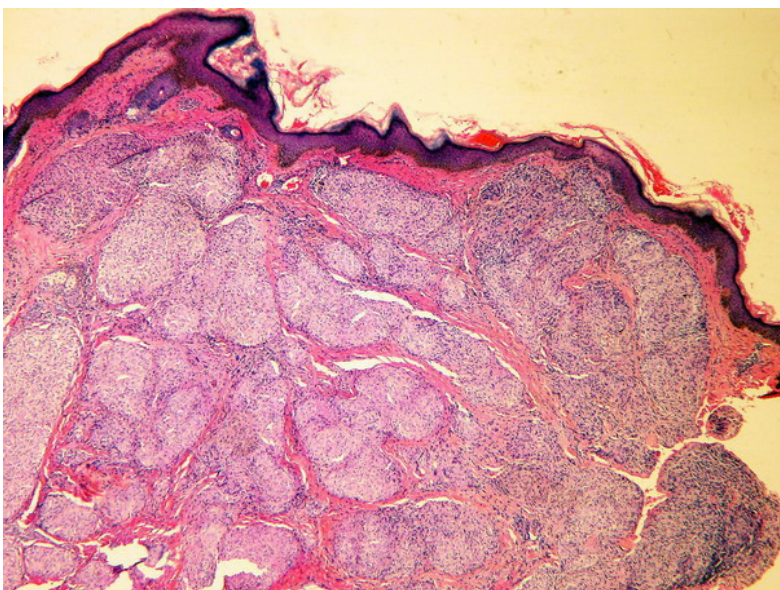
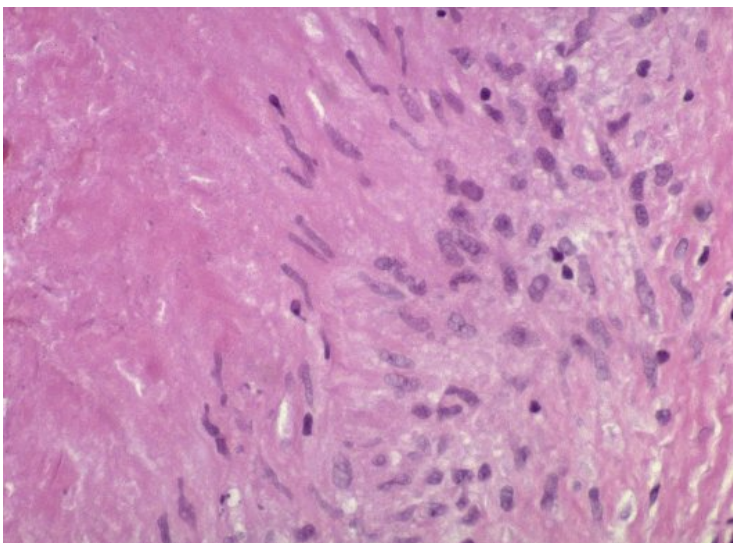


Figura 2: Característico aspecto histopatológico granulomatoso da sarcoidose (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).

Na pele, os granulomas são vistos na derme média, podendo atingir a derme profunda e o tecido subcutâneo. O achado de material birrefringente não afasta o diagnóstico de sarcoidose. Os granulomas não acometem folículos pilosos e nervos. O diagnóstico de sarcoidose só deve ser firmado após a realização das colorações especiais para micobactérias (Ziehl-Neelsen) e para fungos (ácido periódico de Schiff, impregnação pela prata), com a conseqüente demonstração negativa dos bacilos álcool-ácido-resistentes e dos fungos, e da ausência de comprometimento dos filetes nervosos<sup>(8,11,20,32,34,35)</sup>.

- Granulomas necrobióticos: caracterizam-se pela degeneração do colágeno dérmico, denominada necrobiose, envolto por histiócitos e linfócitos dispostos em paliçada<sup>(10,30,32)</sup> (Figura 3).



**Figura 3:** Granuloma necrobiótico (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).

São exemplos de doenças deste grupo: o granuloma anular, a necrobiose lipóidica, o granuloma actínico, o nódulo reumatoide, o granuloma multiforme e o granuloma elastolítico<sup>(10,11)</sup>.

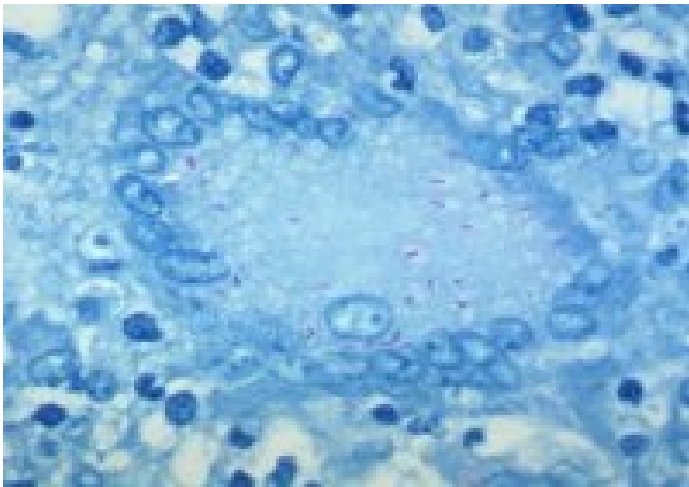
- Granulomas de corpo estranho: o granuloma é provocado por substâncias incapazes de elicitar a resposta imune especializada, sendo também denominados granulomas não-imunológicos. Ao exame histopatológico, caracterizam-se por material estranho fagocitado por histiócitos, que se aglomeram em células gigantes multinucleadas. São exemplos os granulomas provocados por fio de sutura, haste do pelo e cisto epidérmico roto<sup>(10,11,30,31)</sup>.

## **6.2. Métodos laboratoriais diagnósticos das doenças cutâneas granulomatosas infecciosas**

### **6.2.1. Hanseníase**

A identificação do agente causal da hanseníase ocorreu logo após o surgimento da bacteriologia, em fins do século XIX, Armauer Hansen, em 1873, identificou o *Mycobacterium leprae*. Este microorganismo tem forma de bastonete linear ou levemente encurvado, às vezes em forma de clava ou vareta de tambor ou, ainda, em forma de halteres; o comprimento varia de 1,5 a 8µm e a largura entre 0,2 a 0,4µm; é Gram positivo e fortemente álcool-ácido-resistente (BAAR)<sup>(8,12,15,31,38)</sup>. O bacilo de Hansen (BH) é a única micobactéria que perde a capacidade de se corar pela fucsina, quando tratado pela piridina. Aparece isolado ou formando globias – bacilos agrupados mais ou menos numerosos, dispostos paralelamente. O BH, quando íntegro, cora-se

uniformemente em vermelho pelo método de Ziehl-Neelsen<sup>(8,12,14,15,31,37,38,39)</sup>  
(Figura 4).



**Figura 4:** Numerosos bacilos dentro da célula gigante (400x). (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD)

Embora ainda não se tenha obtido o cultivo do BH em meios de cultura, já se consegue sua multiplicação pelas técnicas de inoculação no coxim da pata de camundongo ou em camundongos irradiados e timectomizados. Os resultados destas inoculações são demorados (6 a 8 meses) e a multiplicação do bacilo acaba impedida pelo estado imunitário do animal. O tempo de multiplicação, comparado ao de outras bactérias, é longo, em torno de 14 a 20 dias na pata do camundongo (o *M. tuberculosis* cresce em 20 horas); no homem, esse tempo pode ser maior, justificando a evolução lenta e insidiosa dessa doença<sup>(14,36,38)</sup>.

### 6.2.2. Tuberculose e micobacterioses atípicas

A pesquisa quanto à positividade para os bacilos álcool-ácidos resistentes, através da coloração de Ziehl- Neelsen, é um teste rápido e barato, porém possui baixa sensibilidade, mesmo após repetições da pesquisa para BAAR, os pacientes podem continuar apresentando resultados negativos, mas com evidência clínica da doença<sup>(12,15,37)</sup>.

O padrão-ouro para o diagnóstico é a cultura micobacteriana, entretanto, a velocidade de crescimento de algumas espécies de micobactérias, incluindo o *M. tuberculosis*, é extremamente lenta e requer incubação de 3 a 8 semanas em meio sólido, levando, portanto, algumas semanas para obtenção dos resultados. A cultura apesar de sensível (detecta de 10 a 100 microorganismos por amostra) requer microorganismos viáveis, podendo falhar em pacientes que já estejam sob tratamento; além disso, pode haver contaminação laboratorial, gerando resultados falso-positivos<sup>(26,40,41)</sup>.

A reação imuno-histoquímica pode ser usada quando as colorações específicas para demonstração dos BAAR nos tecidos falham, em virtude do pequeno número de bacilos presentes nas lesões ou quando os pacientes foram submetidos à terapêutica específica prévia que danifica as paredes bacterianas e impede sua coloração pela fucsina, embora também não determine a espécie dentro do gênero *Mycobacterium*<sup>(7,8,13,24,26,40,41,42)</sup>. A imuno-histoquímica é a aplicação do princípio da ligação antígeno-anticorpo para a pesquisa e localização de antígenos em cortes histológicos, através de microscopia óptica, eletrônica ou de fluorescência. A detecção por métodos imuno-enzimáticos tem substituído o método de imunofluorescência, pela facilidade de utilização de microscopia óptica, possibilitando a utilização de

material embocado em parafina e principalmente pelos detalhes histológicos capazes de serem avaliados conjuntamente<sup>(40,41,42)</sup>. O método mais utilizado é o da Avidina-Biotina-Peroxidase, desenvolvida por Hsu et al<sup>(43)</sup>, esta técnica explora a capacidade da avidina, uma glicoproteína moderadamente grande, de formar ligações não-imunológicas com quatro moléculas de baixo peso molecular. Num primeiro momento, o anticorpo primário específico liga-se ao antígeno que se quer localizar; a seguir, o anticorpo secundário, conjugado à biotina, liga-se ao anticorpo primário. Através dos sítios livres de ligação da avidina, o complexo Avidina-Biotina-Peroxidase liga-se ao anticorpo secundário biotilado. A cor da imunomarcação visualizada depende do cromógeno utilizado, usa-se freqüentemente a diaminobenzidina, que produz cor castanho-dourada. A maior sensibilidade desse método, em relação às colorações específicas para detecção de BAAR nos tecidos, tem sido relatada em diversos trabalhos e é atribuída principalmente à possibilidade de detecção de bacilos não íntegros, através da visualização de material antigênico particulado por meio às células epitelioides, à necrose ou no citoplasma dos macrófagos<sup>(40,42,43)</sup>.

Na última década, vários métodos moleculares têm sido desenvolvidos para detecção direta, identificação e teste de susceptibilidade a drogas micobacterianas, com a finalidade de reduzir potencialmente o tempo diagnóstico de semanas para dias, embora haja necessidade de equipamentos sofisticados e pessoal técnico altamente qualificado<sup>(44,45)</sup>. Há vários métodos de amplificação *in vitro* de ácidos nucléicos de micobactérias, o mais conhecido e utilizado é o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), que consiste num sistema de amplificação da seqüência alvo; o objetivo comum dessas técnicas



é reduzir o tempo necessário para a detecção do patógeno em espécimes clínicos, aumentar a sensibilidade e especificidade, e simplificar o teste pela automação<sup>(44,45,46)</sup>.

### 6.2.3. Esporotricose

O *Sporothrix schenckii*, ao exame microscópico da secreção purulenta retirada das lesões cutâneas, apresenta-se sob a forma de corpúsculos Gram positivos, baciliformes, fagocitados por células gigantes ou polimorfonucleares<sup>(12,37)</sup>. Alguns autores recomendam a diluição do pus, 10 a 15 vezes o seu volume, em solução fisiológica e, com esse material, fazer os esfregaços, corando-os pelo Giemsa; a coloração não deve exceder 30 minutos. Nos esfregaços encontram-se formas esféricas do parasito, cercados de halo claro. Corpúsculos radiados em forma de estrela podem ser observados nas lesões esporotricóticas (fenômeno Splendore-Hoeppli)<sup>(12,37,47,48)</sup>. O método indireto de microscopia fluorescente revela facilmente o fungo nas lesões<sup>(47,48)</sup>.

Muitas vezes, as células do *S. schenckii* não são detectadas nos cortes histológicos em série, assim o diagnóstico micológico é efetuado pela obtenção do cultivo do fungo, feito em tubos de ágar Sabouraud, deixando a metade em estuda e a outra à temperatura ambiente<sup>(47,48)</sup>.

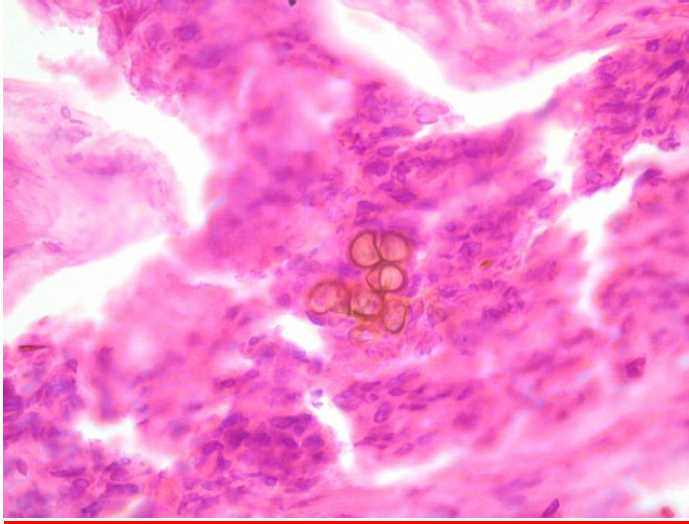
Nos cortes histológicos, corados pelo H&E, as células leveduriformes do *Sporothrix*, além de sua habitual escassez, são dificilmente visualizadas, sendo detectadas apenas pelo emprego de colorações especiais para fungos, elas apresentam-se como formas esféricas ovais e alongadas, em forma de charuto, com 2 a 6 µm de diâmetro, Gram positivas, à vezes irregularmente coradas,

não sendo freqüente o brotamento<sup>(12,37,47,48,49)</sup>. O material radiado e eosinofílico de Splendore-Hoeppli, que envolve a célula leveduriforme do fungo, é, quando presente, detectado pelo H&E, corando-se intensamente pela eosina, não sendo visível quando impregnado pela prata (método de Gomori). Nas lesões primárias de esporotricose, as células leveduriformes do fungo quase nunca são encontradas<sup>(47,48,49)</sup>.

Várias são as provas sorológicas empregadas: reação de aglutinação de Widal & Abrami, reação de fixação do complemento, imunodifusão e a aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com o polissacarídeo do fungo<sup>(47,48)</sup>. Quanto às inoculações em animais de laboratório, um dos mais sensíveis à infecção esporotricótica experimental é o rato, inoculado por via peritonial ou testicular; como resultado da inoculação, manifesta-se por peritonite e orquite específica, notando-se, com a coloração de PAS ou Gram, numerosas células leveduriformes de *S. schenckii*<sup>(47,48)</sup>.

#### **6.2.4. Cromomicose**

O exame direto do material retirado das lesões revela os parasitos em pequeno número, com sua morfologia e coloração características (células muriformes, de cor marrom)(Figura 5). Nem sempre é fácil o achado dos fungos, razão pela qual diversas preparações deverão ser examinadas. Os fungos assumem aspecto característico, as células parasitárias são arredondadas ou elípticas, de coloração parda, membrana bem nítida, de duplo contorno, reproduzindo-se por cissiparidade; outras vezes, observa-se nítida filamentação no material colhido<sup>(8,12)</sup>.



**Figura 5:** Corpos fumagoides na cromomicose (Fonte: <http://granuloma.homestead.com>; Atlas of Granulomatous Diseases, Yase Rosen, MD).

A cultura deve ser praticadas em meio ágar Sabouraud e Czapek, mantidos à temperatura ambiente. As colônias suspeitas aparecem, depois de 7 a 15 dias de cultivo, sob a forma de pequenos pontos pretos, penugentos. As provas imunológicas não são usadas como método de rotina, a reação de fixação do complemento é a que merece atenção especial. Fungos agentes da cromomicose, como *Fonsecaea pedrosoi* e *Cladosporium carrionii*, quando inoculados por via intraperitoneal em camundongos, provocam lesões viscerais, encontrando-se, nos tecidos, células parasitárias idênticas às verificadas nas lesões humanas<sup>(5,8,12,48)</sup>.

### 6.3. Anticorpo policlonal anti-BCG

#### 6.3.1. Informações gerais

O anticorpo policlonal anti-BCG (bacilo de Calmette Guérin) é um anticorpo contra o *Mycobacterium bovis*, extraído de coelhos; seu uso permanece restrito a situações de pesquisa; quando testado usando a técnica de imunoeletroforese cruzada, o anticorpo reage com cerca de 100 diferentes antígenos micobacterianos<sup>(1,3,21,23,24,27,50)</sup>. O anticorpo é adequado para uma detecção sensível de micobactérias em espécimes fixados em formalina, porém, sendo policlonal ele não permite a identificação do tipo específico de micobactéria, ocasionando reações cruzadas<sup>(1,3,12,23,24,27,28,50)</sup>.

O anti-BCG é conhecido por sua alta sensibilidade e mínima coloração de fundo e tem sido investigado como um exame de triagem para biópsias cutâneas que tenham como suspeita um agente infeccioso<sup>(1,2,18,21,40,50)</sup>. A literatura indica que o emprego do anti-BCG, através de reação imunohistoquímica, torna possível a elucidação de vários casos em que o agente etiológico não pode ser identificado com as colorações histoquímicas usuais<sup>(1,2,4,14,21,22)</sup>. Kutzner et al<sup>(1)</sup>, em um estudo com 254 espécimes de lesões cutâneas de etiologias infecciosas variadas, verificou que o anti-BCG apresentava boa qualidade e sensibilidade superior às colorações histoquímica convencionais (Grocott, PAS, mucicarmin, Ziehl-Neelsen, Kinyoun, Warthin-Starry, Dieterle) para o diagnóstico de bactérias e fungos.

Uma característica muito especial do anti-BCG é a de não marcar debris celulares e material necrótico, ao contrário do que ocorre com a maioria dos métodos histoquímicos; cabe ressaltar que este anticorpo marca os

microorganismos da flora normal da pele (a maioria das bactérias e o *Pityrosporum*) e este achado não deve ser erroneamente interpretado<sup>(1,2,14,18)</sup>.

### **6.3.2. Uso do anti-BCG na hanseníase**

Vários autores<sup>(4,14,21,22,23,27,28,51,52,53)</sup> estudaram a utilização deste anticorpo como um método para aumentar a sensibilidade do diagnóstico da hanseníase paucibacilar, pois nestes casos é difícil encontrar os bacilos em amostras de pele usando as colorações histoquímicas usuais para BAAR (por exemplo, Fite-Faraco, Ziehl-Neelsen e Wade).

No estudo de Schettini et al<sup>(4)</sup> sobre a hanseníase em sua forma neural pura, a imuno-histoquímica com o anti-BCG apresentou uma taxa falso-positivos de 16% (8 pacientes com diagnóstico histopatológico de dermatite crônica não-infecciosa, do grupo controle, tiveram imunomarcção positiva com o anticorpo). Por outro lado, 16 casos suspeitos de hanseníase, que haviam apresentado a coloração de Wade negativa, apresentaram positividade estatisticamente significativa com o anti-BCG.

Takahashi et al<sup>(29)</sup> estudou o uso do anti-BCG em pacientes com suspeita de hanseníase na forma indeterminada, o exame rotineiro para a detecção dos BAAR revelou positividade em torno de 20%, quando múltiplos cortes do mesmo caso eram examinados a positividade dobrava, mas com a imuno-histoquímica foi possível detectar a presença do antígeno micobacteriano em 67% dos casos. Em outro estudo sobre hanseníase, dos 28 casos considerados negativos através das colorações rotineiras, 13 deles revelaram-se positivos pela imuno-histoquímica com o anti-BCG<sup>(27)</sup>.

### 6.3.3. Uso do anti-BCG em outras doenças de pele

O anti-BCG tem tido o seu uso expandido e vem sendo testado nas mais diversas situações clínicas<sup>(1,2,5,22,50)</sup>. O anti-BCG foi utilizado para a detecção de microorganismos em dois casos de malacoplaquia cutânea relatados em 2000<sup>(54)</sup>; a malacoplaquia é uma doença granulomatosa infecciosa incomum, que é encontrada primariamente no trato genito-urinário e muito raramente envolve a pele; a malacoplaquia cutânea foi descrita pela primeira vez por LeClerc e Besnier, em 1972<sup>(55,56)</sup>, permanece como uma entidade rara e a pele da região perianal é a relatada como o local mais comumente afetado. Os achados histológicos são marcados pela presença de macrófagos espumosos contendo esférulas concêntricas basofílicas, os corpos de Michaelis-Gutman; os microorganismos dificilmente são prontamente identificados<sup>(54)</sup>. Os microorganismos são freqüentemente difíceis de serem visualizados pelas técnicas histológicas usuais, o organismo mais comumente isolado é a *Escherichia coli*, entretanto, outras bactérias já foram identificadas como *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Rhodococcus* and *Mycobacterium*<sup>(55,56)</sup>. Como o anti-BCG já havia se mostrado particularmente útil em espécimes cutâneos quando o número de organismos é relativamente pequeno<sup>(1)</sup>, Darius Mehregan<sup>(54)</sup>, pela primeira vez, testou este anticorpo em 2 casos de malacoplaquia, que haviam tido resultados negativos com o PAS e o Grocott; a imunomarcação com o anti-BCG evidenciou pequenos acúmulos de bactérias dentro dos histiócitos espumosos em ambos os casos. O diagnóstico diferencial da malacoplaquia inclui os granulomas infecciosos, especialmente os fúngicos; os corpos de Michaelis-Gutman que coram-se com o PAS podem ser confundidos com esporos fúngicos, por isso a imunomarcação com o anti-

BCG foi tão útil nestes casos, por ter diferenciado a coloração negativa das esférulas intracitoplasmáticas da coloração positiva das bactérias dentro dos histiócitos<sup>(54)</sup>.

Em um estudo sobre tuberculose cutânea com cultura e Ziehl-Neelsen negativos, Padmavathy et al<sup>(26)</sup> obteve imuno-histoquímica positiva em 68% dos casos, sendo que a maior positividade foi registrada nos casos de escrofuloderma (89%), seguida pelo lupus vulgar com 69% e a tuberculose verrucosa com 47%.

Em um transplantado renal com infecção subcutânea, as colorações de PAS, Gram e Ziehl-Neelsen foram negativas, enquanto que o anticorpo demonstrou a presença de numerosas bactérias arredondadas, que posteriormente verificou-se tratar do *Mycobacterium abscessus*, indicando uma paniculite infecciosa<sup>(50)</sup>.

Outro estudo bastante interessante é o de Byrd, Mehregan and Mehregan<sup>(2)</sup> sobre o uso do anti-BCG em infecções esporotricoides, que frequentemente apresentam-se como um desafio para os dermatopatologistas, em função do exíguo número de microorganismos e pela extensão do processo inflamatório; dos 13 casos estudados, 12 foram positivos com o anti-BCG, enquanto que com a coloração de PAS somente 6 casos puderam ter os organismos identificados após análise cuidadosa, e somente em um caso com PAS positivo (sem cultura disponível), o anti-BCG foi negativo; os autores classificam o método como de fácil execução e custo-efetivo.

## 7. OBJETIVOS

- Verificar a positividade da reação imuno-histoquímica com o anticorpo policlonal anti-BCG em granulomas imunológicos cutâneos que não puderam ter o seu diagnóstico etiológico definido pelos métodos histoquímicos usuais de coloração para agentes infecciosos (Grocott e Ziehl-Neelsen).

- Descrever a sensibilidade e especificidade do anti-BCG para os casos de granulomas imunológicos cutâneos, através da comparação com os exames culturais para fungos e para micobactérias, e realizar os mesmos cálculos para os controles positivos (pacientes com hanseníase virchowiana) e controles negativos (granulomas anulares e necrobioses lipóidicas).



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Kutzner H, Argenyi ZB, Requena L, Rütten A, Hügel H. A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:56-60.
- 2) Byrd J, Mehregan DR, Mehregan DA. Utility of anti-bacillus Calmette-Guérin antibodies as a screen for organisms in sporotrichoid infections. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:261-4.
- 3) Quan C, Lu CZ, Qiao J, Xiao BG, Li X. Comparative evaluation of early diagnosis of tuberculous meningitis by different assays. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3160-66.
- 4) Schettini AP, Ferreira LC, Milagros R, Schettini MC, Pennini SN, Rebello PB. Enhancement in the histological diagnosis of leprosy in patients with only sensory loss by demonstration of mycobacterial antigens using anti-BCG polyclonal antibodies. *Int J Lepr.* 2001;69(4):335-40.
- 5) Jorge AE, Pierard GE. Immunostaining of various microorganisms by a polyclonal anti *Mycobacterium bovis* antibody. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39:810.
- 6) Szeredi L, Glávits R, Tenk M, Jánosi S. Application of anti-BCG antibody for rapid immunohistochemical detection of bacteria, fungi and protozoa in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Acta Vet Hung.* 2008 Mar;56(1):89-99.
- 7) Duarte MIS, Pagliari C. Moléstias infecciosas. Em: Aves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de Imuno-histoquímica – Sociedade Brasileira de Patologia. 1999. p.195-206.

- 8) Bacchi CE, Gown AM, Bacchi MM. Detection of infectious disease agents in tissue by immunocytochemistry. *Braz J Med Biol Res.* 1994;27(12):2803-20.
- 9) Barbosa Júnior AA, Silva TC, Patel BN, Santos MI, Wakamatsu A, Alves VA. Demonstration of mycobacterial antigens in skin biopsies from suspected leprosy cases in the absence of bacilli. *Pathol Res Pract.* 1994;190(8):782-5.
- 10) Elder D, Elenitsas R, Johnson B, Murphy GI. *Lever's histopathology of the skin.* 9<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Williams and Wilkins; 2004.
- 11) Mckee PH, Calonje E, Granter SR. *Pathology of the skin with clinical correlations.* 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005
- 12) Woods GL, Walker DH. Detection of infection or infectious agents by use of citologic and histologic stains. *Clin Microbiol Rev.* 1996;9:382-404.
- 13) Verma RK, Jain A. Antibodies to mycobacterial antigens for diagnosis of tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51(3):453-61.
- 14) Tomimori-Yamashita J, Maeda SM, Jabur R, Rotta O. Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos. *An Bras Dermatol.* jul/ago1996;71(4):343-349.
- 15) Fleury RN, Aranda CM. Detection of AFB in tuberculoid biopsies. *Int J Lepr.* 1995;63:103-4.
- 16) Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis.* 1990;162:193-200.
- 17) Frevel T, Schafer KL, Totsch M, et al. PCR based detection of mycobacteria in paraffin wax embedded material routinely processed for morphological examination. *Mol Pathol* 1999; 52: 283-8.

- 18) Wiley EL, Beck B, Freeman RG. Reactivity of fungal organisms in tissue sections using anti-mycobacteria antibodies. *J Cutan Pathol.* 1991 Jun;18(3):204-9.
- 19) Bonenberger TE, Ihrke PJ, Naydan DK, Affolter VK. Rapid identification of tissue micro-organisms in skin biopsy specimens from domestic animals using polyclonal BCG antibody. *Vet Dermatol.* 2001;12:41-7.
- 20) Murphy GF: Granulomatous Dermatitis, in *Dermatopathology: a practical guide to common disorders.* W.B. Saunders Company, 1995; 151-171.
- 21) Wiley EL, Mulhollan TJ, Beck B, Tyndall JA, Freeman RG. Polyclonal antibodies raised against *Bacillus Calmette-Guérin*, *Mycobacterium duvalii* and *Mycobacterium paratuberculosis* used to detect mycobacteria in tissue with the use of immunohistochemical techniques. *Am J Clin Pathol.* 1990;94:307-12.
- 22) Natrajan M, Katoch K, Katoch VM, et al. Enhancement in the histological diagnosis of indeterminate leprosy by demonstration of mycobacterial antigens. *Acta Leprol.* 1995;9:201-7.
- 23) Mshana RN, Belehu A, Stoner GL, Harboe M, Haregewoin A. Demonstration of mycobacterial antigens in leprosy tissues. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1982 Mar;50(1):1-10.
- 24) Harboe M, Mshana RN, Closs O, Kronvall G, Axelsen NH. Cross-reactions between mycobacteria. II. Crossed immunoelectrophoresis analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria. *Scand J Immunol.* 1979;9:115-24.
- 25) Wiley EL, Perry A, Nightingale SD, Lawrence J. Detection of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex in bone marrow specimens of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Clin Pathol.* 1994;101:446-51.

- 26) Padmavathy L, Rao LL, Ramanathan VD, Shakila H. Mycobacterial antigen in tissues in diagnosis of cutaneous tuberculosis. *Indian J Tuberc.* 2005;52:31-5.
- 27) Pagliari C, Duarte MIS, Sotto MN. Pattern of mycobacterial antigen detection in leprosy. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995;37(1):7-12.
- 28) Takahashi D, Andrade HF, Wakamatsu A, Manini M, De Brito T. Treated-cured indeterminate leprosy: a search for predictive histopathological and immunohistochemical parameters in skin biopsies taken from patients at admission and at clinical discharge. *Acta Leprologica.* 1992;8(2):95-102.
- 29) Takahashi MD, Andrade HF, Wakamatsu A, Siqueira S, De Brito T. Indeterminate leprosy: histopathologic and histochemical predictive parameters involved in its possible change to paucibacillary or multibacillary leprosy. *Int J Lepr.* 1991;59(1):12-9.
- 30) Dahl MV. Granulomatous Inflammation, in *Clinical Immunodermatology.* 3<sup>a</sup> ed. Mosby, 1996; 253-265.
- 31) Weedon D. *Skin pathology.* 2<sup>nd</sup> ed. London: Churchill Livingstone; 2002.
- 32) Eva Brehmer-Andersson. *Dermatopathology.* Germany: Springer; 2006.
- 33) Dodiuk-Gad R, Dyachenko P, Ziv M, Shani-Adir A, Oren Y, Mendelovici S, et al. Nontuberculous mycobacterial infections of the skin: a retrospective study of 25 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(3):413-20.
- 34) Mañá J, Marcoval J, Graells J, Salazar A, Peyri J, Pujol R. Cutaneous involvement in sarcoidosis. *Arch Dermatol.* 1997;133:882-8.
- 35) Daldon PEC, Arruda LHF. Granulomas não-infecciosos: sarcoidose. *An bras Dermatol.* 2007; 82(6): 559-71.

- 36) Marques SA, Lastória JC, Putinatti MSMA, Camargo RMP, Marques MEA. Paracoccidioidomycosis: infiltrated, sarcoid-like cutaneous lesions misinterpreted as tuberculoid leprosy. Rev Inst Med trop S Paulo. 2008;50(1):47-50.
- 37) Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology, 2<sup>a</sup> ed. Columbus, OH: Battelle Press; 1987.
- 38) Foss NT. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. An bras Dermatol. 1999;74(2):113-9.
- 39) Pavani RAB, Tonolli ER, D'Avila SCGPD. Classificação histopatológica e correlação clínica de 50 casos de hanseníase diagnosticados em um Hospital-Escola, São José do Rio Preto, SP. Medicina (Ribeirão Preto). 2008;41(2):188-95.
- 40) Mustafa T, Wiker HG, Mfinanga SG, Mørkve O, Sviland L. Immunohistochemistry using a *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. Mod Pathol. 2006 Dec;19(12):1606-14.
- 41) Purohit MR, Mustafa T, Wiker HG, Mørkve O, Sviland L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. Diag Pathol. 2007;2:36.
- 42) Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz L, Roth A, Brinkmann V et al. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. J Pathol. 2005;205:633-40.

- 43) Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathol.* 1981;75(6):816-21.
- 44) Bogiatzis KH, Popper GM. Multiplex polymerase chain reaction for rapid detection of atypical mycobacteria and *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Diagn Mol Pathol.* 1998;7:310-6.
- 45) Schluger NW, Kinney D, Harkin TJ, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Chest* 1994; 105: 116-21.
- 46) Frevel T, Schafer KL, Totsch M, et al. PCR based detection of mycobacteria in paraffin wax embedded material routinely processed for morphological examination. *Mol Pathol* 1999; 52: 283-8.
- 47) Donadel KW, Reinoso YD, Oliveira JC, Azulay RD. Esporotricose: revisão. *An bras Dermatol.* 68(1):45-52.
- 48) Mapurunga ACP, Teixeira FLL, Bargiona SP, Gonçalves HMG, Monteiro CM, Lima AAB. Micoses profundas diagnosticadas no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) no período de 1978 a 1989. *An bras Dermatol.* 1991;66(5):243-50.
- 49) Londero AT, Ramos CD. Esporotricose no Rio Grande do Sul: três décadas de observação. *An bras Dermatol.* 1989;64(6):307-10.
- 50) Prinz BM, Michaelis S, Kettelhack N, Mueller B, Burg G, Kempf W. Subcutaneous infection with *Mycobacterium abscessus* in a renal transplant recipient. *Dermatology.* 2004;208:259-61.
- 51) Gonzalez ACO, Silva TC, Barbosa Jr AA, Sadigursky M. Immunohistologic appraisal of infiltrating cells in skin biopsies from young patients clinically

suspected of having various forms of leprosy. *An bras Dermatol.* 1999;74(4):365-71.

52) Pennini SN, Schettini APM, Sardinha JGC. Histopathological alterations in areas of cutaneous sensory loss in the diagnosis of leprosy. *Int J Lepr* 1993; 61:122A.

53) Ridley MJ, Russell DF, Ridley DS. Immunoperoxidase study of immunological factors in skin lesions across the spectrum of leprosy. *Int J Lepr* 1982; 50:11-19.

54) Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Cutaneous malakoplakia: a report of two cases with the use of anti-BCG for the detection for microorganisms.

55) Sarkell B, Dannenberg M, Blaylock K, Patterson J. Cutaneous malacoplakia. *J Am Acad Dermatol.* 1994;30:834-6.

56) Lowitt M, Kariniemi A, Niemi K, Kao G. Cutaneous malacoplakia: report of two cases sand review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 1996;34:325-32.

## **9. ARTIGO EM INGLÊS**

**Anti-BCG polyclonal antibody in the diagnosis of immune-mediated cutaneous granulomas.**

### **Authors**

Letícia Krause Schenato<sup>1</sup>, André da Silva Cartell<sup>2</sup>, Lucio Bakos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Department of Dermatology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Pathology – Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

### **Correspondence**

Letícia Krause Schenato

Rua Coronel Lucas de Oliveira 1155/801; CEP 90440-011, Porto Alegre/Rio Grande do Sul, Brazil

Phone: 55 51 33331359/33325693; e-mail: letische@terra.com.br



## **ABSTRACT**

**Background:** Anti-BCG polyclonal antibody has been tested as an immunohistochemical screening staining in skin biopsies where an infectious origin is suspected. In cases of fungal and mycobacterial cutaneous infections, the results of anti-BCG are shown to be clearly superior to those obtained with conventional histochemical techniques.

**Objective:** To investigate the sensitivity and specificity of the immunohistochemical reaction with anti-BCG polyclonal antibody in immune-mediated cutaneous granulomas, in which the etiological diagnosis cannot be determined by means of the usual histochemical staining methods for infectious agents, by comparing culture tests for fungi and mycobacteria.

**Methods:** Thirty-three (33) skin biopsy specimens with immune-mediated granulomas that had been shown to be negative in Grocott and Ziehl-Neelsen staining were selected; the cases were submitted to an immunohistochemical technique with anti-BCG polyclonal antibody. The same method was applied to 13 cases of lepromatous leprosy and 11 of necrobiotic granulomas, respectively positive and negative controls.

**Results:** Immunohistochemistry with anti-BCG was positive in 13 cases (39.4%). The sensitivity of the method when compared to fungal culture was 57.1% and the specificity was 66.7%; compared to mycobacterial culture, its sensitivity was 100%, although positive in only 2 cases, and the specificity was 67.7%. In the cases of lepromatous leprosy, chosen as positive control, the sensitivity and specificity were 100%.

**Limitations:** The anti-BCG antibody does not permit the identification of the specific type of mycobacteria and labels the micro-organisms of the normal skin flora, this finding should not be mistakenly interpreted as being clinically significant. The small number of cases and laboratory controls perhaps influenced the performance of the anti-BCG.

**Conclusion:** As in the literature, in our study the anti-BCG antibody show to be useful in the identification of micro-organisms, that were not immediately seen using routine histological stains, in skin biopsies with immune-mediated granuloma.

## **INTRODUCTION**

With an ever increasing number of cutaneous specimens from patients with suspected infectious diseases, the identification of the causative agents needs to be improved and optimized; various special histochemical stains and an ever larger number of specific monoclonal antibodies, as well as advanced molecular methods provide the dermatopathologist with a large arsenal for the detection of micro-organisms<sup>(1,2,3,4,5,6)</sup>. Techniques for the immunological interpretation of infectious agents, in general, provide greater sensitivity and specificity to the histopathological analysis, and these have become routine in laboratories<sup>(1,2,4,5,7,8)</sup>. Some authors even recommend systematic immunohistochemical testing with antibodies for mycobacteria in all cases of granulomatous reaction without a defined etiological agent. Hence, such procedures have made a significant contribution towards the diagnosis of infectious diseases<sup>(1,2,4,5,7,8,9,10,11)</sup>.

Immunohistochemical techniques with anti-BCG polyclonal antibody have been tested as an initial method of identifying the presence of some microorganisms in dermatopathological specimens<sup>(1,8)</sup>. Anti-BCG is an anti-*Mycobacterium bovis* antibody, extracted from rabbits, its use is restricted to research situations; when tested using crossed immunoelectrophoresis, the antibody reacts with about 100 different BCG antigens many of which are common to other mycobacteria<sup>(1,2,6,9,10,12,13)</sup>. The antibody is well suited for the sensitive detection of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections by immunohistochemical techniques; as it is polyclonal, analysis with the anti-BCG antibody does not permit the identification of the specific type of mycobacterium, and crossed reactions between different types of this microorganism are frequent<sup>(1,2,6,9,10,11,12,14)</sup>. This antibody does not label virus, spirochetes or protozoa (*Leishmania*), but has the advantage of not reacting against normal cutaneous debris and structures, a property which is particularly useful in cases where the few organisms present are masked/obscured by dense inflammatory infiltrate<sup>(1,2,8,14)</sup>.

In cases of fungal and mycobacterial cutaneous infections, the results of anti-BCG have proven clearly superior to those obtained with conventional histochemical techniques<sup>(1,2,4,5,8,15)</sup>. In indeterminate and tuberculoid leprosy, it is sometimes difficult to find the bacilli in a sample of skin tissue using conventional histopathological stains (Ziehl-Neelsen, Fite Faraco, Wade); many authors have shown that immunohistochemical techniques increase the sensitivity of the histopathological diagnosis of early forms of leprosy by detecting mycobacterial antigens<sup>(9,10,11,15,16,17)</sup>. Similarly, with sporothricosis it is frequently difficult to detect the agent with the stains routinely used for fungi

(Grocott, PAS), especially in cases involving rare organisms and an intense inflammatory process, and the culture, though it may be specific, may require weeks, increasing in that way the morbidity of the cases<sup>(1,5,8,14)</sup>.

The aim of this study was to assess whether the immunohistochemical technique using anti-BCG was able to offer an aid in the etiological diagnosis in granulomatous skin diseases.

## **MATERIAL AND METHODS**

The study was undertaken at the Departments of Dermatology and Pathology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil, after receiving approval from the Research and Ethics Committee of the hospital.

Forty-five (45) formalin-fixed, paraffin-embedded specimens of skin biopsies, carried out between 2002 and 2007, with immune-mediated granulomas that had shown to be negative to Grocott and Ziehl-Neelsen staining were selected; the cases were submitted to the immunohistochemical technique with anti-BCG. In addition, 13 cases of lepromatous leprosy and 11 of non-immune granulomas (6 cases of granuloma annulare and 5 of necrobiosis lipoidica) were selected to serve, respectively, as positive and negative laboratorial controls. Moreover, in the positive controls, Ziehl-Neelsen staining was reapplied according to established procedures<sup>(18)</sup>, in order to compare the images obtained with those with anti-BCG.

Histological sections (4 µm thick), obtained from the material embedded in paraffin blocks were submitted to the immunohistochemical technique with anti-BCG in the Pathology Laboratory of the Research Centre of the HCPA. The immunohistochemistry was carried out according to the steps described briefly

below, based on the technique from Hsu et al<sup>(19)</sup>: (a) rehydration of the slides (xylene - alcohol - distilled water); (b) antigen recovery with citrate buffer and endogen peroxidase blocking; (c) application of primary antibody (DAKO B 0124, Copenhagen) and secondary antibody associated to the avidin-biotin-streptavidin amplification system; (d) application of the diaminobenzidine chromogen solution and counterstain with Harris' hematoxylin. It was impossible to include some cases in the study because the paraffin blocks were not found or because they had been used so much that new histological sections could not be obtained.

The slides were read by a blinded experienced dermatopathologist (A.C.) of the HCPA, this professional was unaware of the previous laboratory tests and clinical data of the patients. There was no attempt to quantify the antigen in the sections and the result was described only as either positive or negative.

The medical charts of the patients were also reviewed in a search for the following data: gender, age, results of the direct smears for fungi and acid-fast bacilli (AFB), fungal and mycobacterial culture, diagnostic hypotheses, therapies and clinical response.

#### *Statistical analysis*

A data bank was organized in Excel program and later the data were exported to SPSS program version 15.0. The measures of the diagnostic performance of the method were based on calculation of the proportions, thus obtaining the sensitivity, the rate of false-negatives, specificity and the rate of false-positives. The quantitative variables were described using the mean and standard deviation and the category variables (sex and comorbidities) by the absolute frequency and percentage of relative frequency.

## RESULTS

Of the 33 studied cases, 13 (39.4%) were shown to be positive to anti-BCG immunohistochemistry: 4 cases of tuberculosis (12.12%) (Figure 1), 4 cases of sporothricosis (12.12%) (Figures 2), 1 case (3.03%) of chromomycosis (Figure 3), 1 case of tuberculoid leprosy (3.03%) and 3 cases (9.09%) in which the diagnosis remained unknown because there was no clinical follow-up. Table 1 includes data on the diagnostic performance of anti-BCG in 3 distinct situations: in comparison with the results of the culture tests for fungi and mycobacteria and in the cases of the positive (lepomatous leprosy) and negative (non-immune-mediated granulomas) laboratory controls.

The male gender predominated, with 18 cases (54.5%); the average age was 54 years. With regard the three most prevalent comorbidities, 6 patients (18.18%) had AIDS, 3 (9.09%) were positive for hepatitis C and 2 (6.06%) had *diabetes mellitus*.

Figures 4 to 6 show comparisons between the staining with Ziehl-Neelsen and the immunolabelling with anti-BCG, and clearly show the advantage offered by the immunohistochemistry in finding the AFB. Although no statistical analyses apply to such a comparison, it is apparent from the figures that the method is useful, even in small amounts, in identifying AFB.

## DISCUSSION

In routine dermatopathological diagnosis, there is a growing demand for quick, simple, effective and affordable methods for the screening micro-organisms<sup>(1,5,8)</sup>. Anti-BCG is known for its interspecies cross-reactivity, high

sensitivity and minimal background staining and has been investigated as a screening test for skin biopsies in which an infectious origin is suspected<sup>(1,2,5,7,8,13,20)</sup>. In a study with 254 specimens of skin lesions with varied infectious etiologies, Kutzner et al<sup>(1)</sup>, found that anti-BCG offered good quality and higher sensitivity than conventional histochemical stains (Grocott, PAS, mucicarmin, Ziehl-Neelsen, Kinyoun, Warthin-Starry, Dieterle) in the diagnosis of bacteria and fungi. In such cases, anti-BCG seems to be very useful, as monoclonal antibodies and polymerase chain reaction are not routinely available, have high cost and are also unsuitable for screening a variety of organisms<sup>(6,21,22,23)</sup>. It should be remembered that cases of leishmaniasis, viruses and syphilis are BCG negative<sup>(1,5,8)</sup>.

A very special characteristic of anti-BCG is that, in contrast to most histochemical methods, it does not label cellular debris and necrotic material. It should be pointed out that this antibody labels the micro-organisms of the normal skin flora (most bacteria and the *Pityrosporum*) and this finding should not be mistakenly interpreted as being clinically significant<sup>(1,5,8,24)</sup>. In figure 2, it is possible to see fungal structures in the hair follicle that were labeled by the anti-BCG, but that have no relationship with the case of sporothricosis diagnosed by the culture.

In relation to the performance of the anti-BCG in terms of sensitivity and specificity, there are few studies that offer this information, perhaps because of the difficulty in organizing a suitable control group, or due to the lack of a diagnostic gold standard, since the antibody, being polyclonal, permits a wide variety of hypotheses. In the present study, based on similar previously published studies with results applicable in the clinical routine, we have

chosen to consider fungal and mycobacterial cultures as gold standard in the diagnosis, though comparison with PCR would be the ideal<sup>(21,22,25,26)</sup>. The 100% rates of sensitivity and specificity found with the use of anti-BCG in the positive (lepomatous leprosy) and negative (non-immune-mediated granulomas) controls may be the result of the small number of cases selected. It is probable that if this part of the sample would be larger, the performance of the antibody could decrease and consequently false-positive and false negative cases could arise, leading to some mistaken diagnoses. Likewise, the 100% sensitivity calculated for the anti-BCG when compared with the mycobacterial culture probably occurred due to the small number of positive cultures. In the study from Schettini et al<sup>(15)</sup> on the diagnosis of pure neural leprosy, anti-BCG had a 16% rate of false negatives, 8 patients with histopathological diagnoses of chronic non-infectious dermatitis, who were allocated to control group, were immunolabeled positive by the antibody. On the other hand, 16 suspected cases of leprosy, that had been considered negative using routine stains (H&E and Wade), were found to have statistically significant positivity with anti-BCG, which provided an enhanced diagnosis of fundamental importance in the early institution of polychemotherapy<sup>(15)</sup>. In the early stages of the disease, diagnosis is difficult because the bacillar load is low and the bacilli may present morphological alterations that lead them to lose the characteristic acid-fast staining<sup>(15,24, 27,28,29)</sup>.

Takahashi et al<sup>(16)</sup> studied the use of anti-BCG in patients with suspected indeterminate leprosy and reported that routine examination for detection of acid-fast bacilli reveals a positivity of about 20%, and when multiple sections were examined positivity doubled, but with immunohistochemistry it was



possible to detect the presence of the mycobacterial antigen in 67% of the cases. It is also important to remember the study by Bakos and Lucas<sup>(30)</sup> on the immunohistochemical analysis of the Mitsuda test, in which 98% of positivity was found with anti-BCG within the granuloma and the absence of mycobacterial antigens in practically all the nerves. Therefore, the neurotropic tendency of the granuloma does not seem to be stimulated by the presence of mycobacterial antigens inside the nerves, as normally these antigens do not penetrate them.

The literature indicates that the employment of immunohistochemistry with anti-BCG makes it possible to elucidate many cases where the etiological agent cannot be identified using the usual histochemical stains<sup>(1,5,8,13,15,17,24)</sup>. In the present study it was not possible to calculate the performance of anti-BCG in comparison with routine stains because in all the cases they were negative, as this was one of the criteria for inclusion in the sample. This type of information is available in studies such as that by Schettini et al<sup>(15)</sup>, in which, of a total of 51 cases, 9 cases (17.6%) were confirmed as leprosy using H&E and/or Wade, while using the anti-BCG antibody it was possible to make the diagnosis in 24 cases (47.1%). In the same study, another important feature of anti-BCG is mentioned, that of facilitating the demonstration of the determinant antigens of *M. leprae* with good quality even in biopsies carried out several years previously and also in pieces fixed in formalin for periods of over 3 days. It is worth noting that the immunolabeling does not reproduce the morphology of the bacilli, it identifies the antigenic material in particles that lie between the epithelioid cells, in the macrophage cytoplasm, amid the necrotic material or in the Schwann cells<sup>(1,4,5,8,9,10,,20)</sup>. In leprosy, the diagnostic criterion is the demonstration of

intracellular yellowish-brown pigment, since the mastocytes and melanocytes may appear similar to immunoreactive cells<sup>(9,10,17)</sup>.

In another study on leprosy<sup>(9)</sup>, of the 28 cases considered negative with the use of routine stains, 13 reacted positively with the use of immunohistochemistry with anti-BCG. Several authors<sup>(9,10,11,13,15,17,24)</sup> have studied the use of this antibody as a method to enhance the sensitivity of the diagnosis of paucibacillary leprosy, since in these cases it is difficult to find the bacilli in a sample of skin tissue using conventional histopathological stains (Fite-Faraco, Ziehl-Neelsen and Waade). Although the design of the present study did not allow to perform statistical analysis, we have demonstrated the facility to identify AFB using immunohistochemistry in figures 4 to 6, which show the visual benefit of anti-BCG when compared to Ziehl-Neelsen. This enhancement that immunolabeling offers over histochemical staining has also been demonstrated by Ulrichs et al<sup>(21)</sup>, using serial dilutions of *M. bovis* cultured and subsequently stained by Ziehl-Neelsen and anti-BCG; the Ziehl-Neelsen stain failed to detect mycobacteria at  $10^4$ , but the antibody stained  $< 10^1$  mycobacteria.

Another interesting study is that from Byrd, Mehregan and Mehregan<sup>(8)</sup> on the use of anti-BCG in sporothricoid infections, which often represent a challenge for dermatopathologists due to the scarcity of micro-organisms and the extension of the inflammatory process; of the 13 cases studied, 12 were positive with anti-BCG, while with PAS staining only 6 cases were identified following careful analysis, and only in one PAS positive case (without available culture), the anti-BCG was negative. This author classified the method as easy to perform and cost effective. In the present study, there were 7 cases of

sporothricosis confirmed by culture, of which 4 were positively immunolabeled; it should be highlighted that culture tests are not routinely requested by medical assistants (12 cases that had been selected could not be included in the statistical analysis due to the lack of culture tests), in these cases anti-BCG is clearly of great use, as, if the result is positive, the doctor would be required to request them or reanalyze the routine stainings in minute detail.

In the present study, of the 6 patients with AIDS presenting granulomas, one was positively labeled with anti-BCG and the final diagnosis of cutaneous tuberculosis was made thanks to clinical findings allied to immunohistochemistry, since the mycobacterial culture was negative. In the literature there are only a few case reports of the use of anti-BCG for skin diseases in patients with AIDS<sup>(6,12,13,21)</sup>; of particular note is the study by Wiley et al<sup>(31)</sup> involving AIDS patients with bacteremia due to *Mycobacterium avium intracellulare*, in which anti-BCG was compared with the Fite-Faraco and Kenyon stains, and the author concluded that immunohistochemistry was more sensitive than the stains to AFB in material from the bone marrow .

Cutaneous tuberculosis constitutes a diagnostic challenge, as it is frequently difficult to demonstrate the causal agent using histopathology and culture requires weeks; the use of immunohistochemistry is particularly useful in immunocompetent patients, in whom there are a small number of bacilli<sup>(4,6,7,21,22,32)</sup>. In the present study, of the 6 cases in which the final diagnosis was tuberculosis, 4 were positively labeled by anti-BCG. Unfortunately, with polyclonal antibodies, there is no way to discriminate the different types of mycobacteria, and there are crossed reactions between them (tuberculosis, atypical mycobacterias and leprosy)<sup>(1,4,6,12,13)</sup>. In a study of

cutaneous tuberculosis with negative culture and Ziehl-Neelsen, Padmavathy et al<sup>(32)</sup> obtained positive immunohistochemistry in 68% of the cases, with the highest positivity being recorded in the cases of scrofuloderma (89%), followed by lupus vulgar with 69% and tuberculosis verrucosa with 47%; it is interesting to note that the antigen was seen within the giant cells, but also extracellularly, dispersed in the mononuclear infiltrate. More recently, a specific antibody for the mycobacterial antigen MPT64 was comparatively tested with anti-BCG in the diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis, and no statistically significant difference was found between the two tests, except that the labeling with anti-MPT64 was more intense in necrotic granulomas<sup>(21,22)</sup>.

The range of uses of anti-BCG has expanded and it has been used in the most different clinical situations<sup>(1,2,8,17,20,33)</sup>. In a kidney transplant with subcutaneous infection<sup>(2)</sup>, the PAS, Gram and Ziehl-Neelsen stains were negative, while the antibody showed the presence of numerous rounded bacteria that were later found to be *Mycobacterium abscessus*, indicating infectious panniculitis. In the present study no case of atypical mycobacteriosis was identified. Diagnostic tests in such cases are known to represent a challenge, since the detection of AFB in cutaneous biopsies is often false-negative, the culture usually requires weeks and the disease can be fatal in immunosuppressed individuals due to the risk of dissemination<sup>(2,3,12,33,34,35)</sup>. Anti-BCG has also been used satisfactorily in two rare cases of cutaneous malakoplakia (granulomatous infectious disease found primarily in the genitourinary tract), in which it is often difficult to find the micro-organism using histochemical techniques<sup>(36)</sup>. The versatility of anti-BCG has also enabled its use by various authors in the Veterinary area and, as Kutzner et al<sup>(1)</sup> found in

humans, immunohistochemistry with this antibody is indicated as the first choice method for the rapid detection of bacteria and fungi in cases where infection is suspected to be the cause of pathological skin lesions and no microorganism can be cultured *in vitro* or only formalin-fixed tissue samples are available for the laboratory examination<sup>(37,38)</sup>.

## **CONCLUSIONS**

The anti-BCG antibody was shown to be useful in the identification of organisms that were not immediately identified using Grocott and Ziehl-Neelsen stains. The immunohistochemical technique with the antibody in question is relatively easy, quick and affordable. Furthermore, it requires no additional training or materials other than those routinely used in any dermatopathological laboratory that works with immunohistochemistry.

The fact that it is polyclonal is seen by us as an advantage, since it makes possible to detect the presence of a wide variety of organisms with a single stain. In cases where the labeling with anti-BCG is positive, the doctor should proceed to carry out additional specific staining, re-assess the staining carried previously or, in cases where it has not already been done, immediately perform a culture test, for both fungi or mycobacterias.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We are grateful to Neiva Copetti, staff member at the Pathology Laboratory of the Research Center at the HCPA, for her assistance with the immunohistochemical techniques and to Carla Pagliari, biologist responsible for

Immunopathology Laboratory at the University of São Paulo, for kindly supplying us with the anti-BCG antibody.

## **FUNDING SOURCES**

Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), at Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## **CONFLICT OF INTEREST**

None declared.

## **REFERENCES**

- 1) Kutzner H, Argenyi ZB, Requena L, Rütten A, Hügel H. A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:56-60.
- 2) Prinz BM, Michaelis S, Kettelhack N, Mueller B, Burg G, Kempf W. Subcutaneous infection with *Mycobacterium abscessus* in a renal transplant recipient. *Dermatology.* 2004;208:259-61.
- 3) Dodiuk-Gad R, Dyachenko P, Ziv M, Shani-Adir A, Oren Y, Mendelovici S, et al. Nontuberculous mycobacterial infections of the skin: a retrospective study of 25 cases. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(3):413-20.
- 4) Verma RK, Jain A. Antibodies to mycobacterial antigens for diagnosis of tuberculosis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51(3):453-61.
- 5) Wiley EL, Beck B, Freeman RG. Reactivity of fungal organisms in tissue sections using anti-mycobacteria antibodies. *J Cutan Pathol.* 1991 Jun;18(3):204-9.

- 6) Quan C, Lu CZ, Qiao J, Xiao BG, Li X. Comparative evaluation of early diagnosis of tuberculous meningitis by different assays. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3160-66.
- 7) Mustafa T, Wiker HG, Mfinanga SG, Mørkve O, Sviland L. Immunohistochemistry using a *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antibody for improved diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Mod Pathol.* 2006 Dec;19(12):1606-14.
- 8) Byrd J, Mehregan DR, Mehregan DA. Utility of anti-bacillus Calmette-Guérin antibodies as a screen for organisms in sporotrichoid infections. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:261-4.
- 9) Pagliari C, Duarte MIS, Sotto MN. Pattern of mycobacterial antigen detection in leprosy. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995;37(1):7-12.
- 10) Mshana RN, Beleh A, Stoner GL, Harboe M, Haregewoin A. Demonstration of mycobacterial antigens in leprosy tissues. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1982 Mar;50(1):1-10.
- 11) Takahashi D, Andrade HF, Wakamatsu A, Manini M, De Brito T. Treated-cured indeterminate leprosy: a search for predictive histopathological and immunohistochemical parameters in skin biopsies taken from patients at admission and at clinical discharge. *Acta Leprologica.* 1992;8(2):95-102.
- 12) Harboe M, Mshana RN, Closs O, Kronvall G, Axelsen NH. Cross-reactions between mycobacteria. II. Crossed immunoelectrophoresis analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria. *Scand J Immunol.* 1979;9:115-24.
- 13) Wiley EL, Mulhollan TJ, Beck B, Tyndall JA, Freeman RG. Polyclonal antibodies raised against Bacillus Calmette-Guérin, *Mycobacterium duvalii* and

*Mycobacterium paratuberculosis* used to detect mycobacteria in tissue with the use of immunohistochemical techniques. Am J Clin Pathol. 1990;94:307-12.

14) Woods GL, Walker DH. Detection of infection or infectious agents by use of citologic and histologic stains. Clin Microbiol Rev. 1996;9:382-404.

15) Schettini AP, Ferreira LC, Milagros R, Schettini MC, Pennini SN, Rebello PB. Enhancement in the histological diagnosis of leprosy in patients with only sensory loss by demonstration of mycobacterial antigens using anti-BCG polyclonal antibodies. Int J Lepr. 2001;69(4):335-40.

16) Takahashi MD, Andrade HF, Wakamatsu A, Siqueira S, De Brito T. Indeterminate leprosy: histopathologic and histochemical predictive parameters involved in its possible change to paucibacillary or multibacillary leprosy. Int J Lepr. 1991;59(1):12-9.

17) Natrajan M, Katoch K, Katoch VM, et al. Enhancement in the histological diagnosis of indeterminate leprosy by demonstration of mycobacterial antigens. Acta Leprol. 1995;9:201-7.

18) Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and Practice of Histotechnology, 2<sup>a</sup> ed. Columbus, OH: Battelle Press; 1987.

19) Hsu SM, Raine L, Fanger H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. Am J Clin Pathol. 1981;75(6):816-21.

20) Glover RA, Cockerell CJ. Demonstration of *Nocardia asteroides* in tissue using polyclonal anti-mycobacterial antibodies. J Cutan Pathol. 1990;17:294.

21) Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz L, Roth A, Brinkmann V et al. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative



*Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. J Pathol. 2005;205:633-40.

22) Purohit MR, Mustafa T, Wiker HG, Mørkve O, Sviland L. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. Diag Pathol. 2007;2:36.

23) Bogiatzis KH, Popper GM. Multiplex polymerase chain reaction for rapid detection of atypical mycobacteria and *Mycobacterium tuberculosis* complex. Diagn Mol Pathol. 1998;7:310-6.

24) Tomimori-Yamashita J, Maeda SM, Jabur R, Rotta O. Hanseníase: novos métodos e recursos diagnósticos. An bras Dermatol. jul/ago1996;71(4):343-49.

25) Williams DL, Gillis TP, Booth RJ, Looker D, Watson JD. The use of a specific DNA probe and polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae*. J Infect Dis. 1990;162:193-200.

26) Choi JH, Koh K, Na DS. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded samples from multibacillary and paucibacillary leprosy patients by polymerase chain reaction. Int J Dermatol. 1993;32:710-3.

27) Chacko CJ. Role of histopathology in the early diagnosis of leprosy. Indian J Lepr. 1993;65:23-7.

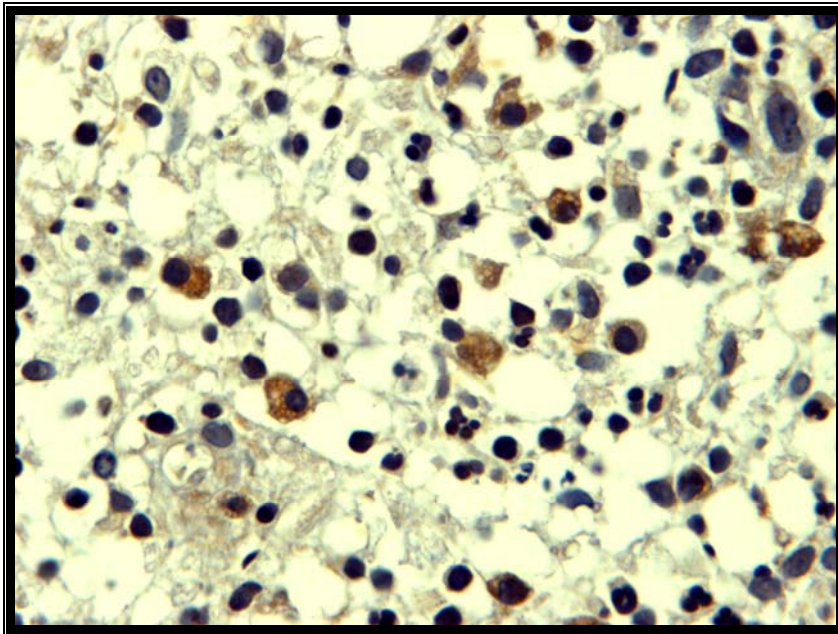
28) Fleury RN, Aranda CM. Detection of AFB in tuberculoid biopsies. Int J Lepr. 1995;63:103-4.

29) Talhari S. Diagnosis, classification and prognosis. Int J Lepr. 1996;64:513-20.

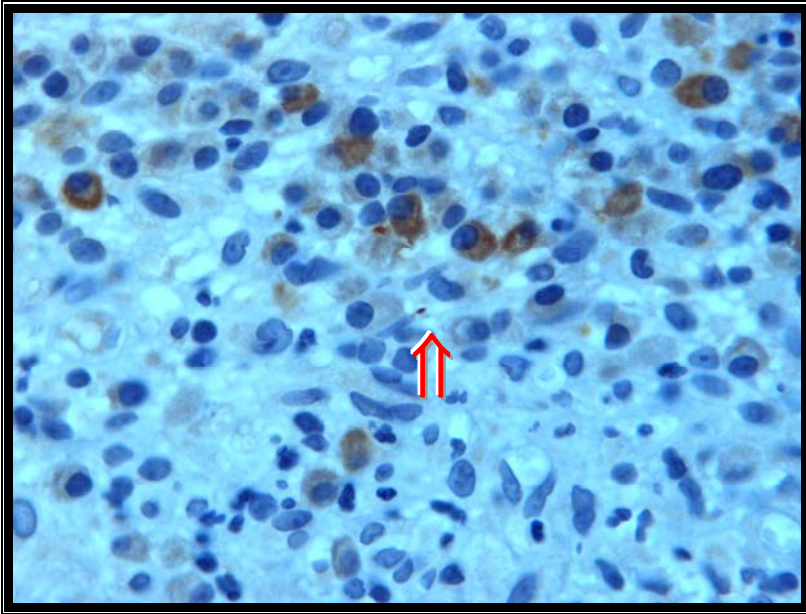
- 30) Bakos, L, Lucas SB. Immunohistochemical study of cutaneous neuritis in positive lepromin reactions. *Lepr Rev.* 1995;66:277-86.
- 31) Wiley EL, Perry A, Nightingale SD, Lawrence J. Detection of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex in bone marrow specimens of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Clin Pathol.* 1994;101:446-51.
- 32) Padmavathy L, Rao LL, Ramanathan VD, Shakila H. Mycobacterial antigen in tissues in diagnosis of cutaneous tuberculosis. *Indian J Tuberc.* 2005;52:31-5.
- 33) Jorge AE, Pierard GE. Immunostaining of various microorganisms by a polyclonal anti *Mycobacterium bovis* antibody. *J Am Acad Dermatol.* 1998;39:810.
- 34) Palenque E. Skin disease and non-tuberculous atypical mycobacteria. *Int J Dermatol.* 2000;39:659-66.
- 35) Rodriguez G, Ortegon M, Camargo D, Orozco LC. Iatrogenic *Mycobacterium abscessus* infection: histopathology of 71 patients. *Br J Dermatol.* 1997;137:214-8.
- 36) Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Cutaneous malakoplakia: a report of two cases with the use of anti-BCG for the detection for microorganisms.
- 37) Szeredi L, Glávits R, Tenk M, Jánosi S. Application of anti-BCG antibody for rapid immunohistochemical detection of bacteria, fungi and protozoa in formalin-fixed paraffin-embedded tissue samples. *Acta Vet Hung.* 2008 Mar;56(1):89-99.
- 38) Bonenberger TE, Ihrke PJ, Naydan DK, Affolter VK. Rapid identification of tissue micro-organisms in skin biopsy specimens from domestic animals using polyclonal BCG antibody. *Vet Dermatol.* 2001;12:41-7.

**TABLE 1** – Diagnostic performance of the anti-BCG against three standard references (fungi culture, mycobacteria culture and laboratory controls) in cases of immune-mediated cutaneous granuloma.

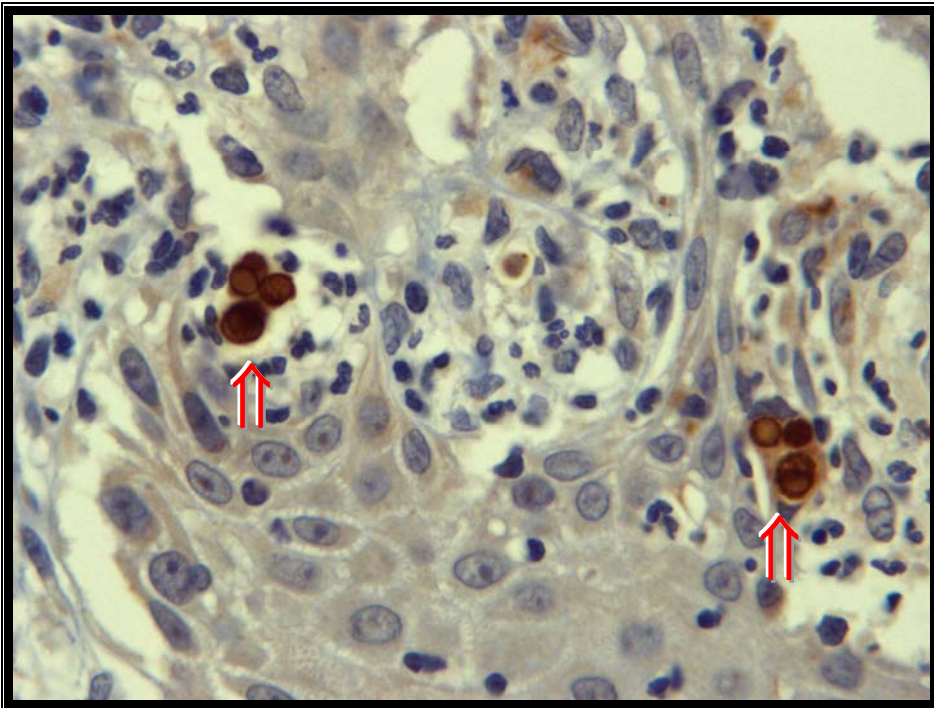
Diagnostic performance of the anti-BCG	Standard Reference		
	Culture		Laboratory Control (n=24)
	Fungi (n=28)	Mycobacteria (n=33)	
Sensitivity	Positives (n=7) 4 (57.1)	Positives (n=2) 2 (100.0)	Positives (n=13) 13 (100.0)
False Negatives	3 (42.9)	0 (0.0)	0 (0.0)
Specificity	Negatives (n=21) 14 (66.7)	Negatives (n=31) 21 (67.7)	Negatives (n=11) 11 (100.0)
False Positives	7 (33.3)	10 (32.3)	0 (0.0)



**Figure 1:** Coccoid structures, stained brown, inside the macrophages, labeled with anti-BCG. Diagnosis of mycobacteriosis by positive culture for *Mycobacterium sp.* (Immersion, 1.000x)

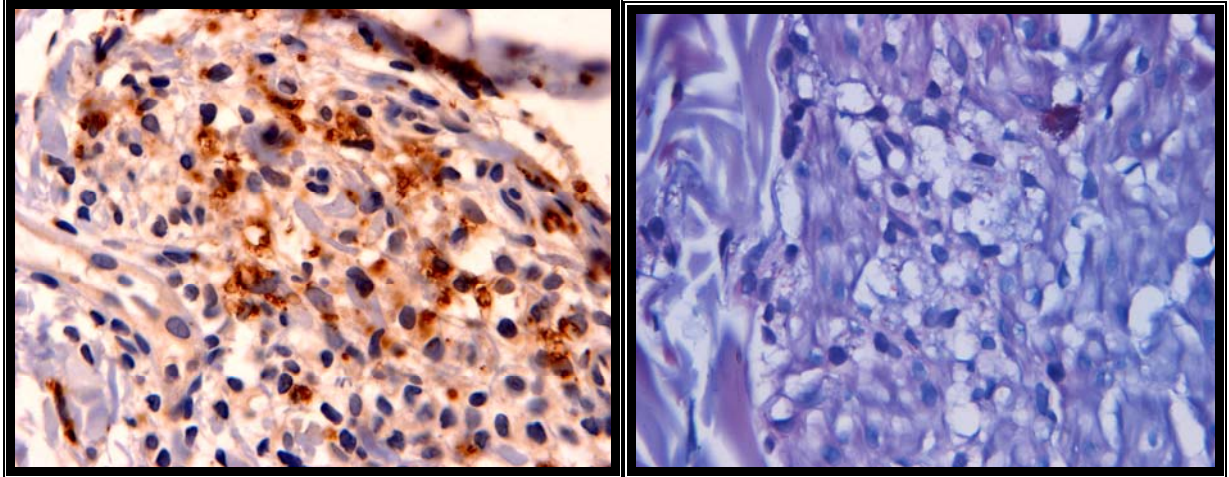


**Figure 2:** Minute brown cigar-shaped structure (arrow) labeled with anti-BCG. Diagnosis of sporothricosis by positive culture for *Sporothrix schenckii*. (Immersion, 1.000x).



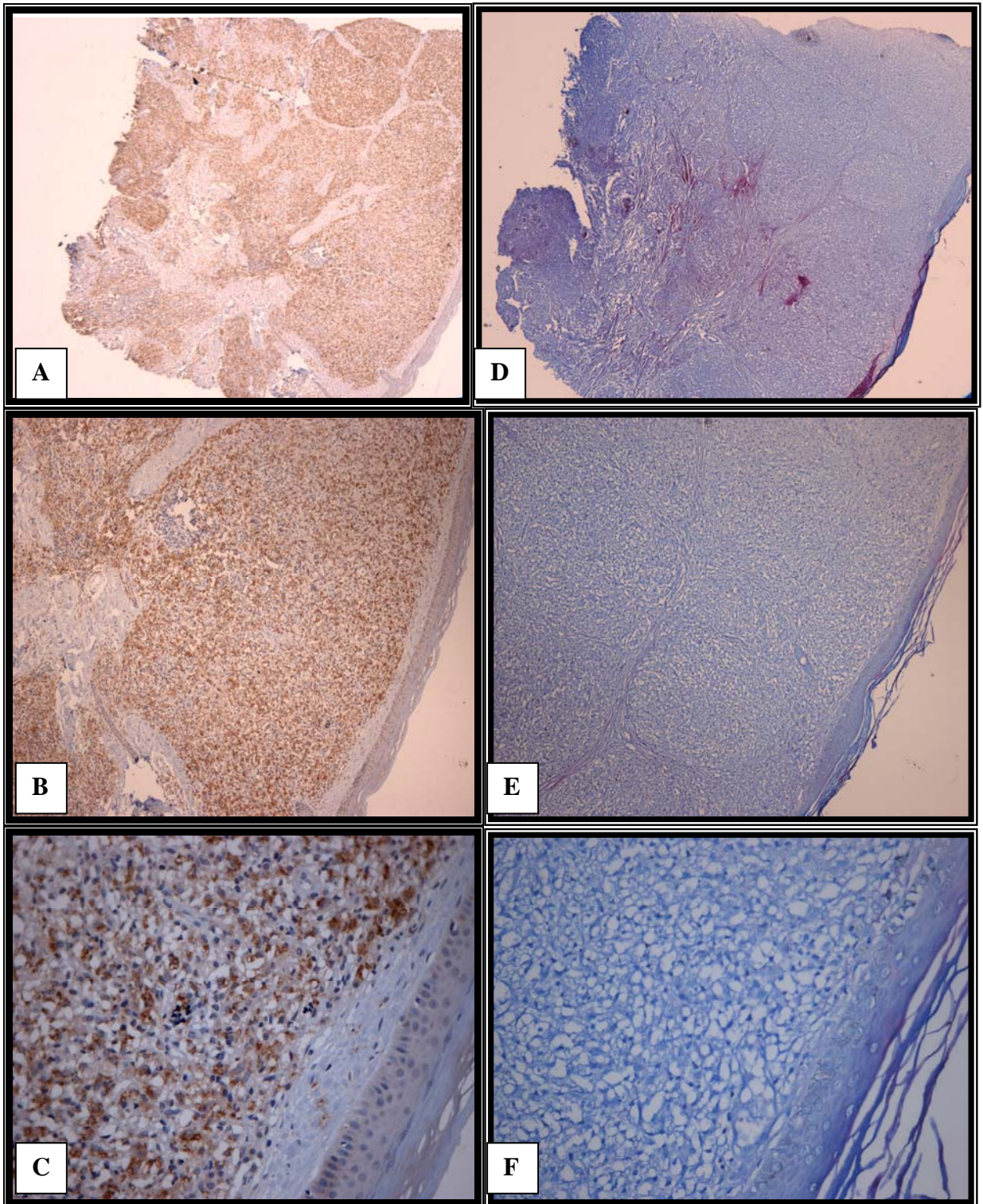
**Figure 3:** Chromomycosis: fumagoid bodies (arrows) labeled with anti-BCG. Diagnosis obtained using immunohistochemistry, as in this case there was a

negative direct smear for fungi and a negative fungal culture. (Immersion, 1.000x).



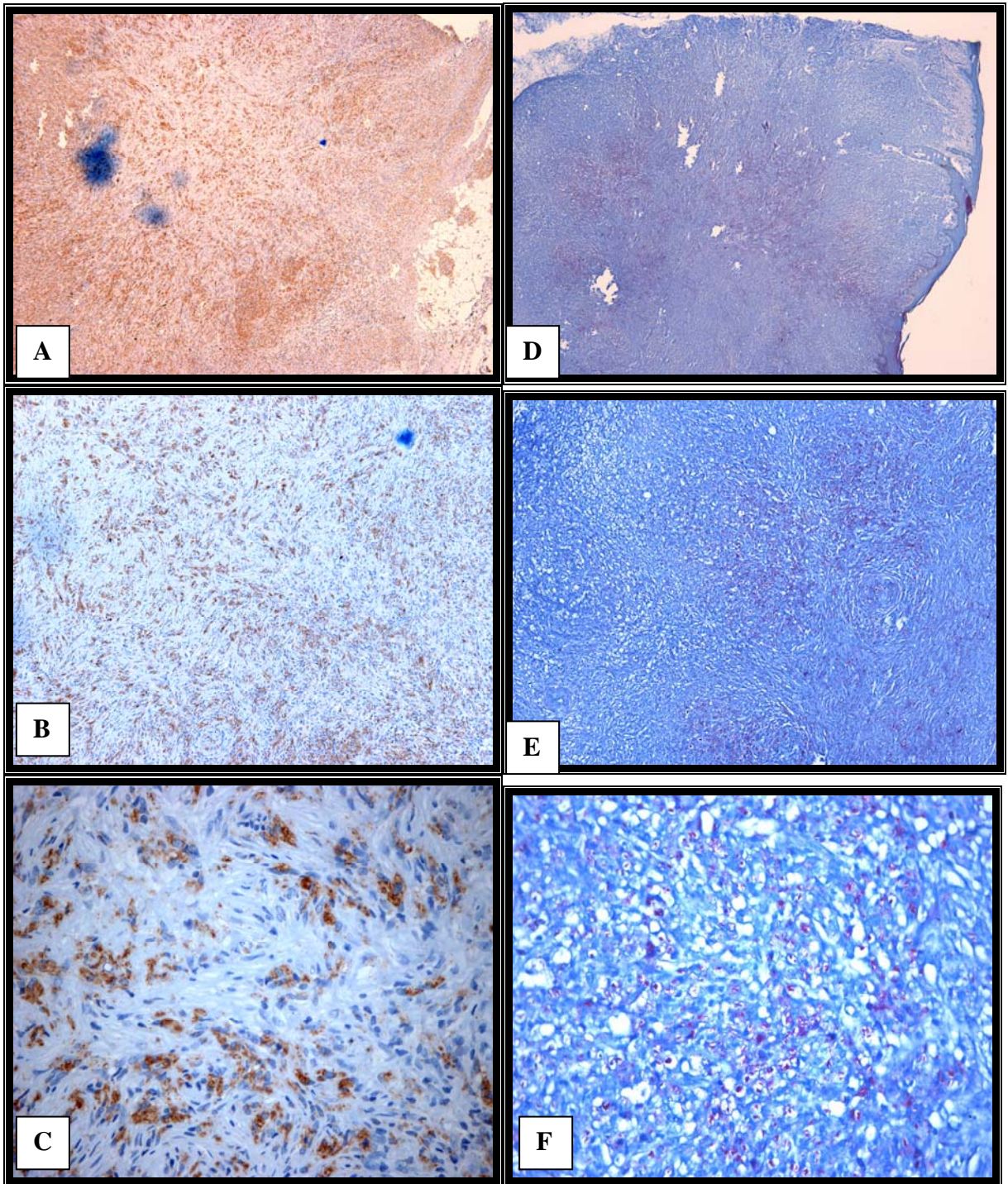
**Figure 4:** Lepromatous leprosy: comparison between Ziehl-Neelsen staining (photo on the right) and immunohistochemistry with anti-BCG (photo on the left), in the erector pili muscle (Immersion, 1.000x).





**Figure 5:** Lepromatous leprosy: comparative photographs of the same areas, from top to bottom at zoom increases of 40x (A and D), 100x (B and E) and 400x (C and F); the photos on the left show labeling with anti-BCG and those on the right, Ziehl-Neelsen staining.





**Figure 6:** Lepromatous leprosy: comparative photographs of the same areas, from top to bottom at zoom increases of 40x (A and D), 100x (B and E) and 400x (C and F); the photos on the left show labeling with anti-BCG and those on the right, Ziehl-Neelsen staining.

## **10. Considerações gerais**

Indispensável à prática da histopatologia moderna, as técnicas de imunohistoquímica vêm se desenvolvendo de forma considerável desde sua introdução no início da década de 1940. Este estudo foi importante, pois no permitiu, pela primeira vez no Rio Grande do Sul, trabalhar de forma acadêmica com o anticorpo policlonal anti-BCG. Talvez, a amostra selecionada, casos de difícil resolução de um hospital terciário de referência para todo o Estado, tenha impedido uma performance mais significativa do anticorpo estudado. Porém, o número de exames com marcação positiva pela imunohistoquímica já nos oferece uma idéia da grande utilidade que este anticorpo pode apresentar nos casos de doenças cutâneas granulomatosas.