

# Estudo histopatológico de casos de eritema crônico migratório diagnosticados em Manaus\* *Histopathological study of erythema chronicum migrans cases diagnosed in Manaus.*\*

Itelvina Suriadakis de Melo<sup>1</sup>Alcidarta dos Reis Gadelha<sup>2</sup>Luiz Carlos de Lima Ferreira<sup>3</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - O estudo das alterações histopatológicas em relação ao eritema crônico migratório (doença de Lyme) e a demonstração do agente etiológico em tecidos são pouco divulgados no Brasil e na Região Norte.

**OBJETIVOS** - Descrever as principais alterações histopatológicas existentes nas biópsias cutâneas de pacientes com diagnóstico clínico de eritema crônico migratório (ECM). Demonstrar a *Borrelia sp* em cortes histológicos.

**MATERIAL E MÉTODOS** - Biópsias da pele de 31 pacientes foram incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos que foram corados em hematoxilina eosina (HE) pelo Warthin Starry e Warthin Starry modificado pH 4.0 (pyrocatecol), visando investigar as principais alterações histopatológicas e demonstrar *Borrelia sp* respectivamente.

**RESULTADOS** - As principais alterações verificadas foram: na epiderme, espongiose em 15 casos (44,12%); na derme, infiltrado constituído por linfócitos, histiócitos e eosinófilos em oito casos (15,69%). O infiltrado na derme foi encontrado em torno de vasos com disposição em manguito em nove casos (29,04%). A *Borrelia sp* foi detectada em um caso (3,22%) pela técnica de coloração de Warthin Starry.

**CONCLUSÕES** - Os infiltrados na derme, constituídos por linfócitos, histiócitos e eosinófilos apresentavam as seguintes disposições: em torno de vasos em forma de manguito e no interstício; em torno de vasos e no interstício. Essa composição e distribuição foram consideradas de maior relevância para o diagnóstico de ECM. Pela primeira vez, na região amazônica brasileira foi demonstrada a presença de *Borrelia sp* em biópsia de paciente com suspeita diagnóstica de ECM em corte histológico corado pela técnica de Warthin Starry.

**Palavras-chave:** *Borrelia*; doença de Lyme; Eritema migrans crônico; histologia.

**Summary:** *BACKGROUND* - The study of histopathological alterations in relation to Erythema chronicum migrans (Lyme disease) and the demonstration of its etiological agent in tissues have been little divulged in our Country and region.

**OBJECTIVES** - To describe the main histopathological alterations in the cutaneous biopsies of patients with clinical diagnosis of Erythema chronicum migrans (ECM). To demonstrate *Borrelia sp* in the histological section.

**MATERIAL AND METHODS** - Skin biopsies were taken from 31 patients and embedded in paraffin to prepare the histological section. These sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) to investigate the main histopathological alterations and with Warthin-Starry silver stain and modified Warthin-Starry stain, at pH 4.0 (pyrocatechol), to demonstrate *Borrelia sp*.

**RESULTS** - The main alterations verified were: in the epidermis, spongiosis in 15 cases (44.12%); in the dermis, an infiltrate comprised of lymphocytes, histiocytes and eosinophils in 8 cases (15.69%). The infiltrate in the dermis was found to be perivascular and angiocentric in 9 cases (29.04%). *Borrelia sp* was detected in 1 case (3.22%) using Warthin-Starry silver stain. However with modified Warthin-Starry stain, at pH 4.0 (pyrocatechol), no case tested positive out of the 31 cases investigated.

**CONCLUSION** - The infiltrations in the dermis were composed of lymphocytes, histiocytes and eosinophils presented the following arrangement: angiocentric and interstitial infiltrate; perivascular and interstitial infiltrate. Composition and arrangement were considered of major relevance for the diagnosis of ECM. For the first time in the Brazilian Amazon region, the presence of *Borrelia sp* was demonstrated in the biopsy of a patient with diagnostic suspicion of ECM using histological sections colored by Warthin-Starry silver stain.

**Key words:** *Borrelia*; Lyme disease; Erythema chronicum migrans; histology.

Recebido em 30.03.2000. / Received in March, 30<sup>th</sup> of 2000.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 05.11.2002. / Approved by the Consultive Council and accepted for publication in November, 05<sup>th</sup> of 2002.

\* Trabalho realizado na Fundação de Dermatologia Tropical e Venerologia Alfredo Da Matta; Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e Laboratórios Reunidos. / Work done at "Fundação de Dermatologia Tropical e Venerologia Alfredo Da Matta; Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e Laboratórios Reunidos."

<sup>1</sup> Mestre em Patologia / Patologista da Fundação Alfredo da Matta / Masters degree in Pathology / Pathologist, Alfredo da Matta Foundation

<sup>2</sup> Doutor em Dermatologia, Professor titulado em dermatologia pela Universidade Federal de Amazonas. / Ph.D. in Dermatology / Titular Professor of Dermatology, Amazon Federal University

<sup>3</sup> Doutor em Patologia, Professor titulado na Universidade Federal do Amazonas. / Ph.D. in Pathology / Titular Professor, Amazon Federal University

©2003 by Anais Brasileiros de Dermatologia

## INTRODUÇÃO

A doença de Lyme (eritema crônico migratório) é moléstia infectocontagiosa sistêmica, causada por espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Borrelia* e transmitida pela picada de carrapatos do gênero *Ixodes* e, provavelmente, dos gêneros *Amblyoma* e *Dermacentor*.<sup>1</sup>

No estudo histopatológico do eritema crônico migratório, Steere *et al.* em 1983 usando a coloração pela hematoxilina eosina (HE) verificaram na derme um infiltrado em forma de manguito constituído por linfócitos, histiócitos, células plasmáticas e mastócitos em biópsias do centro das lesões cutâneas, bem como um infiltrado constituído por linfócitos e histiócitos em torno de vasos em biópsias da borda das lesões.<sup>18</sup>

Berger em 1984, usando a coloração HE, observou na derme superior e profunda um infiltrado perivascular e intersticial composto principalmente de linfócitos ou linfócitos, células plasmáticas e/ou eosinófilos.<sup>5</sup>

Em 1997 Crowson *et al.*, por meio da mesma técnica, demonstraram um infiltrado na derme superficial e profunda em manguito, constituído principalmente por linfócitos com mistura variável de células plasmáticas e eosinófilos.<sup>10</sup>

Os aspectos histológicos do ECM devem ser diferenciados principalmente dos produzidos pelo eritema *marginalum* (*figuratum*); reação à picada de insetos e eritema anular centrífugo,<sup>2</sup> que apresentam algumas alterações capazes de diferenciar do ECM, tais como: no eritema *figuratum* e no eritema anular centrífugo não há plasmócitos, eosinófilos e/ou envolvimento intersticial do infiltrado, como no ECM.<sup>5,9,2</sup> Na reação à picada de insetos existe degeneração do colágeno na derme, e o infiltrado é em forma de cunha, o que não é observado no ECM.<sup>2</sup>

Uma das formas de esclarecer o diagnóstico seria mediante a visualização da *Borrelia sp* nos achados histopatológicos. Entretanto, os resultados obtidos pelos estudiosos, utilizando diversas técnicas de coloração, são bastantes variáveis. Para alguns autores a dificuldade de detecção da *Borrelia sp* nos tecidos biopsiados deve-se à escassez dos microorganismos nas lesões.<sup>4,6</sup> Para Picken *et al.* (1997) a dificuldade de detecção das borrelíias deve-se à não homogeneidade de sua distribuição nas biópsias cutâneas.<sup>14</sup>

Em 1983, Berger evidenciou *Borrelia sp* em lesões de ECM em 12 pacientes do total de 30 examinados, usando a técnica de Warthin Starry.<sup>5</sup> Posteriormente e pela mesma técnica, Berger *et al.* (1985) relataram a visualização da *Borrelia sp* em apenas dois casos de 11 biópsias de pacientes com ECM.<sup>6</sup>

Em 1986, De Koning *et al.* demonstraram *Borrelia sp* usando a técnica de impregnação pela prata de Bosma Steiner em 14 biópsias de pacientes com a doença de Lyme.<sup>11</sup>

No Brasil, Briggs *et al.* (1993) apresentaram no XLVIII Congresso de Dermatologia, em Curitiba, um caso de demonstração da *Borrelia sp* em paciente de seis anos, residente no Estado do Rio de Janeiro.<sup>8</sup>

## INTRODUCTION

*Lyme disease* (erythema chronicum migrans) is a systemic infectious disease caused by a bacterial species belonging to the genus *Borrelia* and transmitted by the bite of ticks of the genus *Ixodes* and probably also by *Amblyoma* and *Dermacentor*.<sup>1</sup>

In the histopathological study of erythema chronicum migrans (ECM), Steere *et al.* (1983) using hematoxylin and eosin (HE) stain, verified an angiocentric infiltrate in the dermis comprised of lymphocytes, histiocytes, plasmatic cells and mastocytes in biopsies from the center of the cutaneous lesions, as well as an infiltrate constituted by lymphocytes and histiocytes around the blood vessels in biopsies from the border of the lesions.<sup>18</sup>

Berger (1984), using HE, observed a perivascular and interstitial infiltrate in the upper and lower dermis, composed mainly of lymphocytes or lymphocytes, plasmatic cells and/or eosinophils.<sup>5</sup>

In 1997, Crowson *et al.*, working with the same technique, demonstrated an angiocentric infiltrate in the upper and lower dermis, constituted mainly by lymphocytes with a varying mixture of plasmatic cells and eosinophils.<sup>10</sup>

The histological aspects of ECM should be differentiated principally from those produced by erythema marginatum (erythema figuratum), reaction to the bite of insects and erythema annulare centrifugum,<sup>2</sup> which present certain alterations capable of differentiating them from ECM, such as: in erythema figuratum and in erythema annulare centrifugum there are no plasmocytes, eosinophils and/or interstitial involvement of the infiltrate, as in ECM.<sup>5,9,2</sup> Furthermore, in reactions to insect bites there is a degeneration of the collagen in the dermis and the infiltrate is in wedge form, which is not observed in ECM.<sup>2</sup>

One of the ways of clarifying the diagnosis would be through visualization of the *Borrelia sp* among the histopathological findings. However, the results obtained by researchers using several staining techniques have been very varied. For some authors, the difficulty of detecting *Borrelia sp* in the biopsy tissue is due to the low number of microorganisms in the lesions.<sup>4,6</sup> According to Picken *et al.* (1997) the difficulty of detecting *Borrelia sp* is due to the non-homogeneity of their distribution in the cutaneous biopsies.<sup>14</sup>

In 1983, Berger demonstrated *Borrelia sp* in ECM lesions of 12 patients out of a total of 30, using the Warthin-Starry technique.<sup>5</sup> Later and using the same silver staining, Berger *et al.* (1985) reported the visualization of *Borrelia sp* in only two of 11 biopsies from patients with ECM.<sup>6</sup>

In 1986, De Koning *et al.* demonstrated *Borrelia sp* through the impregnation technique with Bosma Steiner's silver in 14 biopsies of patients with Lyme disease.<sup>11</sup>

In Brazil, Briggs *et al.* (1993) at the XLVIII Congress of Dermatology, held in Curitiba, presented a demonstration case of *Borrelia sp* in a six-year-old patient, resident in the State of Rio de Janeiro.<sup>8</sup>

No Estado do Amazonas os três primeiros casos da doença foram relatados por Talhari *et al.* (1987), por meio da epidemiologia, da clínica e das alterações histopatológicas.<sup>19</sup> Posteriormente, um levantamento em Manaus mostrou que no período de 1987 a 1990 havia 13 casos com características clínicas sugestivas de ECM, sendo que uma paciente com a idade de 70 anos apresentou lesões cutâneas e sintomas articulares sugestivos da doença de Lyme.<sup>20</sup>

Visto que a doença pode proporcionar alterações sistêmicas com graus variáveis de seqüela, os autores consideram de interesse médico e de saúde pública realizar uma revisão dos casos da doença, diagnosticados no período de 1986 a 1996, buscando contribuir com uma possível definição dos padrões histopatológicos, seja por tipo de lesão tecidual, seja pela pesquisa de *Borrelia sp.*

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi feito por meio do levantamento de prontuários de pacientes com eritema crônico migratório registrados na Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta, Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e Laboratórios Reunidos, abrangendo o período de fevereiro de 1986 a junho de 1996.

Propondo-se os objetivos do trabalho, foram selecionados para o estudo e nele incluídos 31 casos de ECM. Desses, 27 já tinham sido examinados por outros patologistas, dos quais três casos já haviam sido apresentados no XLII Congresso Brasileiro de Dermatologia em 1987, realizado em Goiânia, 13 haviam sido publicados com o diagnóstico de Lyme por Talhari *et al.* (1992) e quatro surgiram no decorrer deste estudo.

Foram utilizados 31 blocos de parafina com fragmentos de pele, retirados de lesões de pacientes com suspeita clínica de ECM. Antes do emblocamento em parafina, as biópsias foram fixadas em formol a 10% por período de 24 horas. Foram feitos cortes histológicos com espessura de até seis micra e corados pela técnica de hematoxilina eosina (HE) visando investigar as principais alterações histopatológicas.<sup>15</sup>

Visando demonstrar *Borrelia sp* os cortes histológicos foram corados pelas técnicas de Warthin Starry e Warthin Starry modificado pH 4.0 (pirocatecol).<sup>17,16</sup> Num e noutro procedimento foi utilizada uma lâmina para cada caso estudado com cortes tissulares que variavam de quatro a 12.

Os resultados foram apresentados em tabelas, e as comparações, feitas por meio de percentuais.

## RESULTADOS

As principais alterações histopatológicas observadas na epiderme e derme estão representadas nas tabelas 1 e 2; a disposição do infiltrado encontrado na derme, na tabela 3 e na figura 1.

De acordo com os cortes histológicos corados pelo Warthin Starry modificado pH 4.0 (pirocatecol) (Figura 2) não houve positividade para *Borrelia sp* nos 31 casos examinados. Pela técnica de Warthin Starry, a *Borrelia sp* foi

*In the State of Amazonas the first three cases of the disease were reported by Talhari et al. (1987), through the epidemiologic and clinic aspects and histopathological alterations.<sup>19</sup> Later, research in Manaus showed that from 1987 to 1990 there were 13 cases with clinical characteristics suggestive of ECM, and a 70-year-old patient presented cutaneous lesions and articular symptoms suggestive of Lyme disease.<sup>20</sup>*

*Since the disease can cause systemic alterations with varying degrees of sequels, the authors considered it would be in the interests of medicine and public health to carry out a revision of the cases of the disease, diagnosed from 1986 to 1996, with a view to contributing to a possible definition of the histopathological patterns, both for the type of tissular lesion and for investigation of *Borrelia sp.**

## MATERIAL AND METHODS

*The present study was undertaken through a retrospective analysis of the files of patients with erythema chronicum migrans registered at the Foundation of Tropical Dermatology and Venereology Alfredo of Matta, Foundation of Tropical Medicine of Amazonas and United Laboratories (Laboratórios Reunidos), from February 1986 to June 1996.*

*In accordance with the objectives of the work, 31 cases of ECM were selected for the study. Of these, 27 had already been examined by other pathologists and three cases had been presented at the XLII Brazilian Congress of Dermatology in 1987, held in Goiânia, 13 had been published with the diagnosis of Lyme disease by Talhari et al. (1992) and four appeared during the course of this study.*

*A total of 31 paraffin blocks were prepared with skin fragments, collected from the lesions of patients with clinical suspicion of ECM. Before embedding in paraffin, the biopsies were fixed in 10% formol for 24 hours. Histological sections were made with a thickness of up to six micra and stained with hematoxylin and eosin (HE) in order to investigate the main histopathological alterations.<sup>15</sup>*

*With a view to demonstrating *Borrelia sp*, histological sections were also stained with Warthin-Starry and modified Warthin-Starry at pH 4.0 (pyrocatechol) techniques.<sup>17,16</sup> In both procedures, a slide was used for each case with tissue sections that varied from four to 12.*

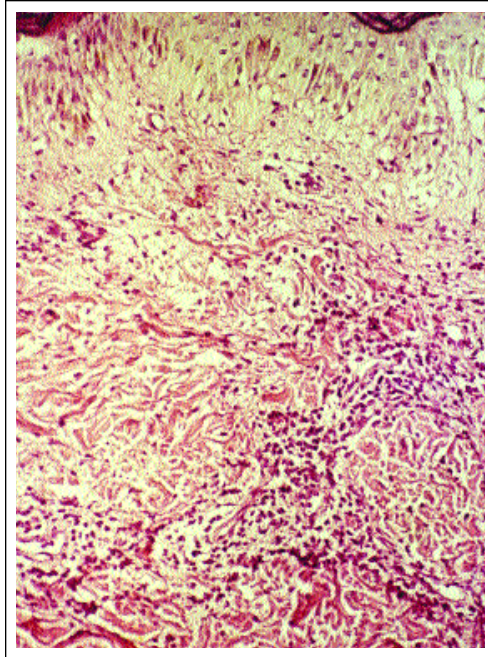
*The results are presented in tables, and comparisons are given as percentages.*

## RESULTS

*The main histopathological alterations observed in the epidermis and dermis are summarized in tables 1 and 2; the arrangement of the infiltrate found in the dermis is shown in table 3 and figure 1.*

*According to the histological sections stained using modified Warthin-Starry at pH 4.0 (pyrocatechol) (Figure 2) there was no positivity for *Borrelia sp* in all 31 cases examined. While with the Warthin-Starry technique, *Borrelia sp**

**Figura 1: Disposição do infiltrado inflamatório na derme, no interstício e em torno dos vasos, constituído de linfócitos, histiócitos e plasmócitos. Na coloração pela técnica de hematoxilina eosina (X 200).**



**Figure 1: Arrangement of the inflammatory infiltrate in the dermis, interstitium and around the veins, comprised of lymphocytes, histiocytes and plasmacytes. Stained with hematoxylin and eosin (X 200).**

detectada em um caso (3,22%) (Figura 3).

was detected in one case (3.22%) (Figure 3).

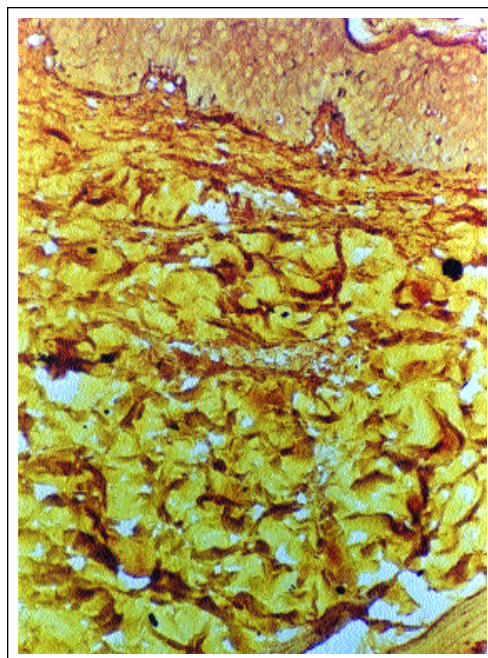
## DISCUSSÃO

As alterações histopatológicas do ECM com infiltrado de linfócitos ou linfócitos e plasmócitos; linfócitos, histiócitos, plasmócitos e/ou eosinófilos descritas por vários autores,<sup>5,11,18</sup> têm suas limitações por não serem específicas do ECM; porém, pelo aspecto em forma de manguito e comprometimento intersticial do infiltrado, podem ajudar no esclarecimento do diagnóstico.<sup>3,10,18</sup> Por isso foram investigadas nos 31 casos a composição e disposição do infiltrado nos cortes teciduais.

Quanto à composição do infiltrado, os resultados referentes ao presente estudo com 11,76% dos casos (Tabela 2) de infiltrado de linfócitos, histiócitos e plasmócitos na derme e na epiderme, acantose em 32,35% e espongiose em 44,12% dos casos (Tabela 1), também foram vistos por Steere *et al.* (1983), que verificaram na derme infiltrado constituído por linfócitos, histiócitos e plasmócitos em 15,60%. Na epiderme verificaram moderada acantose e espongiose, cujos percentuais, porém não especificaram.<sup>18</sup>

Crowson *et al.* (1997) descreveram em biópsias do centro da lesão infiltrado de linfócitos, eosinófilos e plasmócitos, e, na periferia da lesão, infiltrado de linfócitos e plasmócitos. Os autores não especificaram as percentagens dos achados.<sup>10</sup>

Neste estudo foi encontrado infiltrado constituído por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos em 5,89% dos casos (Tabela 2), porém não foi conseguida informação sobre a loca-



**Figura 2: Corte histológico corado pela técnica de Warthin Starry modificado pH 4 (pirocatecol) (X 200).**

## DISCUSSION

The histopathological alterations of ECM with infiltrates of lymphocytes or lymphocytes and plasmacytes; lymphocytes, histiocytes, plasmacytes and/or eosinophils have been described by several authors,<sup>5,11,18</sup> These are limited as a diagnostic tool, since they are not specific to ECM; however, on considering the angiocentric form and interstitial involvement of the infiltrate they can help in clarifying the diagnosis.<sup>3,10,18</sup> Consequently, the composition and arrangement of the infiltrate in the tissue sections were investigated in the 31 cases.

Regarding the composition of the infiltrate, the results of the present study were 11.76% of the cases (Table 2) with lymphocytes, histiocytes and plasmacytes in the dermis and in the epidermis, acanthosis in 32.35% and spongiosis in 44.12% of the cases (Table 1). Similar findings were reported by Steere *et al.* (1983), who observed an infiltrate in the dermis constituted by lymphocytes, histiocytes and plasmacytes in 15.60%. In the epidermis they verified moderate acanthosis and spongiosis, but did not specify the percentages.<sup>18</sup>

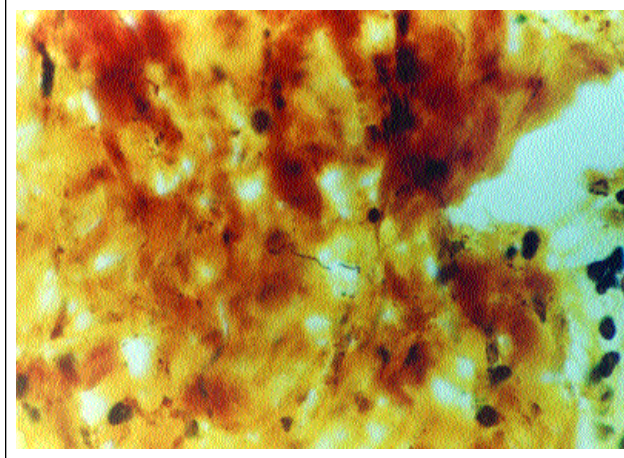
Crowson *et al.* (1997) described an infiltrate of lymphocytes, eosinophils and plasmacytes in biopsies from the center of the lesion and in the periphery of the lesion an infiltrate of lymphocytes and plasmacytes. Again the authors did not specify percentages for the findings.<sup>10</sup>

In the present study, an infiltrate was observed comprised of lymphocytes, plasmacytes and

**Figure 2: Histological section stained using the modified Warthin-Starry technique, at pH 4 (pyrocatechol) (X 200).**



**Figura 3: Borrelia sp. Presença de duas borrelíias na derme superior, na coloração pela técnica de Warthin Starry (X 1000).**



**Figure 3: Borrelia sp. Presence of two Borrelia spirochetes in the upper dermis, stained by Warthin-Starry silver stain (X 1000).**

lização das biópsias, se do centro ou da borda da lesão.

Berger (1984) constatou na derme infiltrados em torno de vasos e intersticial com predomínio de linfócitos; linfócitos mais células plasmáticas ou linfócitos mais células plasmáticas e eosinófilos em 61% dos casos. Nas biópsias da periferia da lesão constatou a predominância de plasmócitos e, nas do centro da lesão, a predominância de eosinófilos. Em 38,23% verificou na derme superficial e profunda infiltrado de linfócitos e histiócitos.<sup>5</sup>

Neste estudo observou-se infiltrado de linfócitos e plasmócitos associados a histiócitos em 11,76% dos casos e de linfócitos e histiócitos em 9,80% dos casos (Tabela 2). A disposição do infiltrado em torno de vasos e no interstício foi encontrada em total de 45,17% dos casos (Tabela 3).

Em relação a De Koning *et al.* (1986) que descreveram em biópsias do centro da lesão infiltrado na derme composto por linfócitos, histiócitos, plasmócitos e eosinófilos em 42,85% dos casos, observou-se nos resultados deste trabalho a mesma composição dos autores em 7,84% dos casos (Tabela 2). Essa diferença em percentual pode estar associada ao local biopsiado ou ao tempo de evolução da doença.

Quanto à disposição do infiltrado inflamatório, os resultados histopatológicos mostrados neste estudo com infiltrado principalmente de linfócitos, histiócitos e eosinófilos; linfócitos, plasmócitos e eosinófilos com disposição em torno de vasos em forma de manguito em 29,04% dos casos (Tabela 3), foi superior ao encontrado por Steere *et al.* (1983) que apresentaram infiltrado de linfócitos, histiócitos e plasmócitos em forma de manguito em 15,60% dos casos.<sup>18</sup>

Crowson *et al.* (1997) também observaram infiltrado inflamatório de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos com disposição em forma de manguito, porém não especificaram a porcentagem dos achados.<sup>10</sup>

A disposição do infiltrado em torno de vaso e no interstício, neste trabalho constituída principalmente de linfócitos, histiócitos, plasmócitos e eosinófilos; linfócitos, histiócitos e eosinófilos, foi encontrada em 19,35%. E a disposição em torno de vasos em forma de manguito e no interstício, constituída principalmente de linfócitos, histiócitos e eosinófilos, e de linfócitos e histiócitos, alcançou o total de 25,82% (Tabela 3). Asoma desses dois

eosinophils in 5.89% of the cases (Table 2), however information was not available regarding the site of the biopsies, specifically if from the center or border of the lesion.

Berger (1984) described an infiltrate in the dermis around the veins and interstitium with prevalence of lymphocytes; lymphocytes together with plasmatic cells or lymphocytes with plasmatic cells and eosinophils in 61% of the cases. In biopsies of the periphery of the lesion a predominance of plasmocytes was found while in the center of the lesion eosinophils predominated. In 38.23% an infiltrate of lymphocytes and histiocytes was observed in the upper and lower dermis.<sup>5</sup>

In this study, an infiltrate was observed of lymphocytes and plasmocytes associated to histiocytes in 11.76% of the cases and of lymphocytes and histiocytes in 9.80% (Table 2). The arrangement of infiltrate around the veins and in the interstitium was found in a total of 45.17% of the cases (Table 3).

In relation to De Koning *et al.* (1986) who described an infiltrate in the dermis, from biopsies of the center of the lesion, which was composed of lymphocytes, histiocytes, plasmocytes and eosinophils in 42.85% of the cases, the same composition was observed in 7.84% of the cases presented in this work (Table 2). The differences in the percentiles could be associated to the site of the biopsy or disease duration.

Regarding the arrangement of the inflammatory infiltrate, the histopathological results shown in this study with infiltrates of mainly lymphocytes, histiocytes and eosinophiles; lymphocytes, plasmocytes and eosinophiles with angiocentric arrangement are present in 29.04% of the cases (Table 3), which is a higher value than that found by Steere *et al.* (1983) who reported an angiocentric infiltrate of lymphocytes, histiocytes and plasmocytes in 15.60% of the cases.<sup>18</sup>

Crowson *et al.* (1997) also observed an angiocentric inflammatory infiltrate of lymphocytes, plasmocytes and eosinophiles, however they did not specify the percentage of the findings.<sup>10</sup>

The arrangement of the infiltrate around the veins and in the interstitium, observed in this work was constituted mainly of lymphocytes, histiocytes, plasmocytes and eosinophiles; lymphocytes, histiocytes and eosinophiles, and it was found in 19.35%. While with an angiocentric arrangement and in the interstitium, constituted mainly of lymphocytes, histiocytes and eosinophiles; and of lymphocytes and histiocytes, reached a total of 25.82%

**Tabela 1: Alterações histopatológicas observadas na epiderme de 31 pacientes com eritema crônico migratório pelo método de hematoxilina eosina. / Table 1: Histopathological alterations observed in the epidermis of 31 patients with erythema chronicum migrans, using hematoxylin and eosin.**

Alterações histopatológicas <i>Histopathological alterations</i>	N.	%
Paraceratose / <i>Parakeratosis</i>	3	8.82
Acantose / <i>Acanthosis</i>	11	32.35
Espongiose / <i>Spongiosis</i>	15	44.12
Exocitose / <i>Exocytosis</i>	4	11.76
Vacuolização de células da camada basal / <i>Vacuolization of the basal layer cells</i>	1	2.95
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>100</b>

**Obs: Os 31 pacientes podem ter mais de uma alteração histopatológica na epiderme. / The 31 patients can present more than one histopathological alteration in the epidermis.**

resultados em que existe comprometimento do interstício pelo infiltrado foi 45,17% dos casos, resultado de valor significativo no presente estudo para o diagnóstico de ECM, pois o comprometimento do interstício pelo infiltrado inflamatório no ECM tem sido descrito por alguns autores,<sup>3,5,9,10</sup> que destacaram a importância desse achado histológico no diagnóstico de ECM.

Com a identificação de apenas um caso positivo para *Borrelia sp* neste trabalho, observa-se que o diagnóstico histopatológico de ECM com o achado do agente etiológico é difícil, muitas vezes pela escassez da *Borrelia sp* nas lesões, como relatado por Berg *et al.* (1991) e Florião (1994).<sup>4,13</sup> O encontro do parasita requer exame minucioso em lâminas coradas pela técnica da prata sem interferência de artefatos, como descrito por De Koning *et al.* (1986).

Neste trabalho, utilizando-se a técnica do Warthin

(Table 3). The sum of these two results in which there was involvement of the interstitium by the infiltrate was 45.17% of the cases, a result of significant value in the present study for the diagnosis of ECM, because involvement of the interstitium by the inflammatory infiltrate in ECM has been described by various authors,<sup>3,5,9,10</sup> who highlighted the importance of this histological finding for the diagnosis of ECM.

With the identification of only one positive case due to *Borrelia sp* in this work, it was demonstrated that the histopathological diagnosis of ECM through isolation of the etiological agent is difficult, frequently due to the lack of *Borrelia sp* in the lesions, as reported by Berg *et al.* (1991) and Florião (1994).<sup>4,13</sup> The finding of the parasite requires a meticulous exam in slides stained using the silver technique and with no interference of artifacts, as described by De Koning *et al.* (1986).

**Tabela 2: Aspectos principais dos infiltrados e alterações observadas na derme de 31 pacientes com eritema crônico migratório pelo método de hematoxilina eosina. / Table 2: Principal aspects of the infiltrates and alterations observed in the dermis of 31 patients with erythema chronicum migrans, using hematoxylin and eosin.**

Infiltrado e alterações na derme <i>Infiltrate and alterations in the dermis</i>	N.	%
Linfócitos e histiócitos / <i>Lymphocytes and histiocytes</i>	5	9.80
Linfócitos, histiócitos e plasmócitos / <i>Lymphocytes. Histiocytes and plasmocytes</i>	6	11.76
Linfócitos, plasmócitos e eosinófilos / <i>Lymphocytes. plasmocytes and eosinophils</i>	3	5.89
Linfócitos, histiócitos, plasmócitos e eosinófilos / <i>Lymphocytes. histiocytes. plasmocytes and eosinophils</i>	4	7.84
Linfócitos, histiócitos e eosinófilos / <i>Lymphocytes. histiocytes and eosinophils</i>	8	15.69
Linfócitos e neutrófilos / <i>Lymphocytes and neutrophiles</i>	1	1.96
Linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos / <i>Lymphocytes. plasmocytes. eosinophils and neutrophiles</i>	1	1.96
Linfócitos, histiócitos e melanófagos / <i>Lymphocytes histiocytes and melanophages</i>	1	1.96
Linfócitos, histiócitos, eosinófilos e melanófagos / <i>Lymphocytes. histiocytes. eosinophils and melanophages</i>	1	1.96
Plasmócitos e eosinófilos / <i>Plasmocytes and eosinophils</i>	1	1.96
Congestão de vasos / <i>Congestion of veins</i>	6	11.76
Edema na derme / <i>Edema in dermis</i>	12	23.53
Ectasia vascular / <i>Ectasia vascular</i>	2	3.93
<b>Total</b>	<b>51</b>	<b>100</b>

**Obs: Os 31 pacientes podem ter mais de uma alteração na derme. / The 31 patients can present more than one histopathological alteration in the dermis.**

**Tabela 3: Disposição do infiltrado nos 31 casos de pacientes com eritema crônico migratório pela técnica de hematoxilina eosina. / Table 3: Arrangement of infiltrate in 31 cases of patients with erythema chronicum migrans, using hematoxylin and eosin.**

Composição do infiltrado <i>Composition of the infiltrate</i>	Disposição do infiltrado / <i>Arrangement of the infiltrate</i>							
	Em torno de vasos <i>Around the veins</i>		Em torno de vaso em manguito <i>Angiocentric</i>		Em torno de vaso e no interstício / <i>Around the veins and in the interstitium</i>		Em torno de vaso em manguito e no interstício / <i>Angiocentric and in the interstitium</i>	
	N.	%	N.	%	N.	%	N.	%
Linfócitos e histiócitos <i>Lymphocytes and histiocytes</i>	1	3.22	–	–	1	3.22	3	9.69
Linfócitos, histiócitos e plasmócitos <i>Lymphocytes, histiocytes and plasmocytes</i>	4	12.91	1	3.22	1	3.22	–	–
Linfócitos, histiócitos, plasmócitos e eosinófilos <i>Lymphocytes, histiocytes, plasmocytes and eosinophils</i>	1	3.22	–	–	2	6.47	1	3.22
Linfócitos, histiócitos e eosinófilos <i>Lymphocytes, histiocytes and eosinophils</i>	1	3.22	3	9.69	1	3.22	3	9.69
Linfócitos, histiócitos e melanófagos <i>Lymphocytes, histiocytes and melanophages</i>	1	3.22	–	–	–	–	–	–
Linfócitos, histiócitos, eosinófilos e melanófagos <i>Lymphocytes, histiocytes, eosinophils and melanophages</i>	–	–	–	–	–	–	1	3.22
Linfócitos, plasmócitos e eosinófilos <i>Lymphocytes, plasmocytes and eosinophils</i>	–	–	3	9.69	–	–	–	–
Linfócitos, plasmócitos, eosinófilos e neutrófilos <i>Lymphocytes, plasmocytes, eosinophils and neutrophils</i>	–	–	1	3.22	–	–	–	–
Linfócitos e neutrófilos <i>Lymphocytes and neutrophils</i>	–	–	1	3.22	–	–	–	–
Plasmócitos e eosinófilos <i>Plasmocytes and eosinophils</i>	–	–	–	–	1	3.22	–	–
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>25.79</b>	<b>9</b>	<b>29.04</b>	<b>6</b>	<b>19.35</b>	<b>8</b>	<b>25.82</b>

Starry modificado pH 4.0 pirocatecol,<sup>16</sup> não se detectou a presença de *Borrelia sp* em nenhum dos cortes histológicos examinados nem se observou a coloração amarelo-pálido ou marrom-claro terroso dos tecidos examinados, nem a impregnação do agente etiológico pela prata. No corte em que se demonstrou o agente etiológico do ECM, usou-se a técnica do Warthin Starry, sem modificações.<sup>17</sup> Observaram-se com essa técnica coloração amarelo-pálido do tecido e impregnação pela prata de *Borrelia sp* em preto.

Neste trabalho, a demonstração da *Borrelia sp* em

*In this work, using the method of modified Warthin-Starry at pH 4.0 pyrocatechol,<sup>16</sup> the presence of Borrelia sp was not detected in any of the histological sections examined nor was the usual pale yellow or earthy light brown coloration observed in any of the tissues examined, nor the impregnation of the etiological agent by the silver. In the section in which the etiological agent of ECM was demonstrated, the Warthin Starry technique was used without modifications.<sup>17</sup> With this technique the pale yellow coloration of the tissue and black aspect marking the impregna-*

apenas um caso está em concordância com os achados da borrelia no Brasil, uma vez que Filgueira *et al.* (1989)<sup>13</sup> a demonstraram em um caso e, em 1993, em outro,<sup>8</sup> embora não tivessem especificado a quantidade de exames pesquisados. Aproxima-se também dos achados de Berger *et al.* (1985), que identificaram dois casos (18,18%) de 11 biópsias de pacientes com ECM.

A literatura especializada confirma a dificuldade do encontro da *Borrelia sp.*, pois Florião (1994) em sua tese de doutorado em dermatologia, defendida no Rio de Janeiro, examinando cortes histológicos de 92 casos suspeitos de borreliose, corados pelo método de Warthin Starry, não evidenciou caso algum positivo para o agente etiológico. Também Steere *et al.* (1983), nos EUA, em exame de 20 biópsias de ECM, empregando o método de Dieterle, não detectaram caso algum positivo para *Borrelia sp.*<sup>18</sup>

De Koning *et al.* (1986, 1987) fizeram uso da técnica da impregnação pela prata, segundo modificações de Bosma Steiner (1984) e demonstraram a presença de *Borrelia sensu lato* em lesões de ECM em 42,85% e em 43,48% dos casos respectivamente.<sup>7,11,12</sup> Quanto à diferença de porcentagem em relação aos achados de Koning *et al.* (1986, 1987) e os do presente estudo, supõem os autores que possa ter sido pelo uso de método de coloração mais aprimorado, pois fizeram uso da prata modificada de Bosma Steiner, em que empregaram a substância amilase com o objetivo de remover o material mucóide do tecido e com isso facilitar a impregnação do agente etiológico pela prata. Outras explicações seriam o local da biópsia e o tempo de evolução da lesão.

Neste estudo não foi possível empregar o mesmo método de De Koning *et al.*, pois as substâncias para coloração compradas foram retidas pela alfândega e posteriormente extraviadas.

## CONCLUSÃO

Neste estudo os achados histológicos que melhor caracterizam o ECM sem a demonstração da *Borrelia sp* são: infiltrado constituído por linfócitos, histiócitos e eosinófilos; linfócitos, histiócitos, plasmócitos e/ou eosinófilos e linfócitos, plasmócitos e eosinófilos com disposição em torno de vasos em forma de manguito e no interstício; em torno de vasos e no interstício são fortes indicações de ECM. Contudo, para melhor avaliação histológica, sugeriram os autores aos dermatologistas que informassem junto com os dados clínicos dos pacientes a localização das biópsias efetuadas: se o centro ou a borda da lesão.

De acordo com essa composição e disposição do infiltrado descritas, concluíram eles que 23 casos (74,19%) seriam realmente ECM e que, em oito casos (25,81%) dos 31 examinados, os achados não foram tão característicos de ECM pelo seguintes aspectos: disposição do infiltrado só em torno de vasos e pela composição do infiltrado associado a neutrófilos e melanófagos.

Foi verificado que a técnica de Warthin Starry é útil

tion of *Borrelia sp* by the silver were observed.

*In this work, the demonstration of Borrelia sp in only one case is in agreement with the findings for Borrelia in Brazil as a whole, since Filgueira et al. reported one such case in 1989<sup>13</sup> and another in 1993,<sup>8</sup> although they did not specify the total number of tests carried out. The finding of Borrelia is also in accordance with the work of Berger et al. (1985), who identified two cases (18.18%) out of 11 biopsies from patients with ECM.*

*The specialized literature confirms the difficulty of detecting Borrelia sp. Florião (1994), in a doctoral thesis in dermatology defended in Rio de Janeiro, examined histological sections of 92 suspected cases of borreliosis using the Warthin-Starry stain and did not find a single positive case for the etiological agent. Furthermore, Steere et al. (1983), in the USA, examined 20 biopsies of ECM using Dieterle's stain and also did not detect any positive case for Borrelia sp.<sup>18</sup>*

*De Koning et al. (1986 and 1987) used the silver impregnation technique, according to modifications by Bosma Steiner (1984) and demonstrated the sensu lato presence of Borrelia in ECM lesions in 42.85% and 43.48% of the cases, respectively.<sup>7,11,12</sup> Regarding the difference in percentages relating to the findings of De Koning et al. (1986, 1987) and those of the present study, it is suggested that Bosma Steiner's modified silver used by the authors may be a more sensitive coloration method, in that amylase is included with the objective of removing mucoid material from the tissue in order to facilitate the impregnation of silver into the etiological agent. Other explanations could be related to the site of the biopsy and duration of the lesion.*

*In this study it was not possible to use the same method as De Koning et al., because the substances imported for the staining were seized and later misplaced by the customs.*

## CONCLUSION

*In this study the histological findings that best characterize ECM without demonstration of Borrelia sp were: infiltrate constituted by lymphocytes, histiocytes and eosinophils; lymphocytes, histiocytes interstitium, plasmocytes and/or eosinophils; and lymphocytes, plasmocytes and eosinophils with angiocentric arrangement and in the interstitium; or around the veins and in the interstitium are strong indications of ECM. Nevertheless, for a better histological evaluation, the authors suggest that dermatologists determine the patients' clinical data and site of the biopsies, i.e. whether they were from the center or border of the lesion.*

*According to the composition and arrangement of the infiltrate described, it was concluded that 23 cases (74.19%) were in fact ECM and that in 8/31 cases (25.81%) examined, the findings were not as characteristic of ECM due to the following aspects: arrangement of the infiltrate only around the veins and due to the composition of the infiltrate being associated to neutrophils and melanophages.*

*It was found that the Warthin-Starry technique is*



para o diagnóstico histopatológico de ECM no Brasil. Novas técnicas além das utilizadas neste estudo deverão, contudo, ser testadas visando aumentar o índice de detecção do agente etiológico nos cortes histológicos.

O exame histopatológico de ECM poderá auxiliar no diagnóstico diferencial com outras dermatoses. □

*useful for the histopathological diagnosis of ECM in Brazil. New techniques besides those used in this study should, however, be tested with a view to increasing the rate of detecting the etiological agent in the histological sections.*

*The histopathological exam of ECM can aid in the differential diagnosis with other dermatoses.* □

## REFERÊNCIAS / REFERENCES

1. Abele DC, Ander KH. The many faces and phases of borreliosis I. Lyme disease. *J Am Acad Dermatol* 1990;23(2):167-86.
2. Ackerman AB, Chongchitnant N, Sanchez I et al. Erythema marginatum. In: lehdorff H, Leiner C, eds. *Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases*. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997:350-51.
3. Ackerman AB, Chongchitnant N, Sanches I et al. Inflammatory diseases: Erythema chronicum migrans. In: Ackerman AB ed. *Histologic diagnosis of inflammatory skin diseases*. 2 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997:233-37.
4. Berg D, Abson KG, Prose NS. The laboratory diagnosis of Lyme disease. *Arch Dermatol* 1991;127:866-69.
5. Berger Bw. Erythema chronicum migrans of Lyme disease. *Arch Dermatol* 1984;120:1017-21.
6. Berger BW, Kaplan MH, Rothenberg IR et al. Isolation and characterization of Lyme disease spirochete from the skin of patients with erythema chronicum migrans. *J Am Acad Dermatol* 1985;13(3):444-49.
7. Bosma RB. Spirochetenkleuring volgens "Gabriel Steiner". *Histotechnick* 1984;5:162-66.
8. Briggs PL, Fraga S, Filgueira AL. Doença de Lyme: Apresentação de um caso com demonstração de Borrelia. In: Congresso Brasileiro Dermatologia, resumos do 48º, 1993, Curitiba.
9. Cregg TM, Wright NA, Mckee PH. Inflammatory dermatoses. Erythema chronicum migrans. In: Marsden RA, Headington JT, Mackie R, eds. *Pathology of the skin*. London: Gower Medical, 1989:802-14.
10. Crowson NA, Magro C, Mihm JRM. Lyme disease. Treponemal disease. In: Lever WF, Elder D, Elenitsas R et al. *Lever's Histopathology of the skin*. 8th ed. Raven: Lippincott, 1997:503-15.
11. De Koning J, Hoogkamp-Korstaje JAA. Diagnosis of Lyme disease by demonstration of spirochetes in tissue biopsies. *Zbl Bakt Hyg A* 1986;263:179-88.
12. De Koning J, Bosma RB, Hoogkamp-korstaje JAA. Demonstration of spirochetes in patients with Lyme disease with modified silver. *J Med Microbiol* 1987;23:261-67.
13. Florião RA. Borreliose de Lyme. Determinação de manifestações peculiares a BL entre os pacientes que freqüentam o HUCFF. Tese. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1994.
14. Picken MM, Picken RN, Han D et al. Two years prospective study to compare culture and polymerase chain reaction amplification for the detection and diagnosis of Lyme borreliosis. *Fortschr Med* 1997;115(35):35-6.
15. Prophet EB, Mills B, Arrington JB et al. Harris' hematoxylin and eosin procedure. In: Allen TC, ed. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington, DC: American Registry of Pathology, 1994:53-8.
16. Prophet EB, Mills B, Arrington JB et al. Modified Warthin Starry method (pH 4.0) for spirochetes and other microorganisms. In: Arrington JB, ed. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington, DC: American Registry of Pathology, 1994:203-33.
17. Serapião CJ, Silva PFO. Método de Warthin Starry para treponemas em corte, segundo Serapião & Silva. Métodos selecionados de colorações e de impregnação argênticas. In: Michalany J, ed. *Técnica histológica em anatomia patológica*. São Paulo: Pedagógica Univeritária, 1980:123-79.
18. Steere AC, Bartenhagen NH, Craft JE et al. The early clinical manifestation of Lyme disease. *Ann Intern Med* 1983;99(7):76-82.
19. Talhari S, Schettine APM, Parreira VJ et al. Eritema crônico migrans. Doença de Lyme - Estudo de três casos. In: Congresso Brasileiro de Dermatologia, resumos do 42º, 1987, Goiânia.
20. Talhari S, Talhari A, Ferreira LCL. Eritema cronicum migrans, eritema migratório, doença de Lyme ou borreliose de Lyme. *An bras Dermatol* 1992;67(5):205-9.

### ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA: / MAILING ADDRESS:

**Itelvina Suriadakis de Melo**

**Av. Constantino Nery, 233 / 104**

**Manaus AM 69010-160**

**Tel: (92) 233-0834 / (92) 9984-1389**