

# DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DIFERENCIAL DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA E VISCERAL

## DIFFERENTIAL LABORATORY DIAGNOSIS OF CUTANEOUS AND VISCERAL LEISHMANIASIS

GABRIELA ARTHUSO ROCHA<sup>1</sup>, LYON JOSÉ DA COSTA PEREIRA<sup>1</sup>, MARIA CAROLINA INÁCIO DA SILVA<sup>1</sup>, MARINA EDUARDA ARRUDA FAUSTINO SILVA<sup>1</sup>, MATEUS FELIPE RODRIGUES<sup>1</sup>, VICTOR OLIVEIRA SILVA<sup>1</sup>, VANESSA BRÉDER GOMES<sup>2\*</sup>

1. Acadêmicos de graduação do curso de Biomedicina da Faculdade Única de Ipatinga; 2. Bacharel em Fisioterapia pela Universidade Católica de Petrópolis (2002), Mestre em Ciências da Motricidade Humana pela UCB (2006). Especialista em Fisioterapia Traumato Ortopédica Funcional (2004, UCB). Docente da Faculdade Única de Ipatinga.

\* Rua Dom Pedro II, 300, apto. 102, Cidade Nobre, Ipatinga, Gerais, Brasil. CEP: 35162-399. [breder.vanessa@gmail.com](mailto:breder.vanessa@gmail.com)

Recebido em 11/11/2021. Aceito para publicação em 07/12/2021

### RESUMO

As leishmanioses são zoonoses de clima tropical, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, o mosquito palha, tendo sua forma mais comum a leishmaniose cutânea e a mais rara e grave a leishmaniose visceral. O objetivo desta revisão é de descrever os tipos de diagnóstico laboratorial diferencial da Leishmaniose Cutânea e Visceral, o exame parasitológico, imunológico, citológico/histológico e o exame molecular. O diagnóstico da leishmaniose varia de acordo com os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da doença, e a execução e sensibilidade de cada exame podem variar de acordo com as formas clínicas, assim os exames parasitológicos e citológicos/histológicos mostraram maior eficácia para um diagnóstico mais simples, rápido e eficaz, mas não se pode esquecer dos exames imunológicos e molecular no qual possui grande precisões de resultados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leishmaniose cutânea, Leishmaniose visceral, Diagnóstico laboratorial.

### ABSTRACT

Leishmaniasis are zoonoses of tropical climate, caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of the female sand fly *Lutzomyia longipalpis*, the straw mosquito, the most common form being cutaneous leishmaniasis and the rarest and most serious being visceral leishmaniasis. The aim of this review is to describe the types of differential laboratory diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis, the parasitological, immunological, cytological/ histological, and molecular examinations. The diagnosis of leishmaniasis varies according to the clinical, epidemiological and laboratory aspects of the disease, and the execution and sensitivity of each exam may vary according to the clinical forms, so the parasitological and cytological/histological exams showed greater efficacy for a more accurate diagnosis.

simple, fast and effective, but one cannot forget about the immunological and molecular exams in which it has great precision of results.

**KEYWORDS:** Cutaneous leishmaniasis, Visceral leishmaniasis, Laboratory diagnosis.

### 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, com maior número de casos na América Latina, sendo o Brasil o país com o número maior de incidência e presente em todas suas regiões, com ênfase nas regiões norte, nordeste e centro-oeste. Pelo saneamento básico ambiental ineficiente e a alta nos desmatamentos, a doença tem se propagado pelo país<sup>1</sup>. Pode manifestar em homens e animais, principalmente os cães, transmitindo de cães para cães e cães para homens. A principal forma de transmissão se dá pela picada de fêmeas de dípteros da família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* (conhecidos como flebotomíneos), infectadas com o protozoário, quando se alimentam do sangue de uma pessoa não infectada. A *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente como mosquito-palha é a principal espécie de flebotomíneo transmissora da *Leishmania infantum* no Brasil, principal agente etiológico nas Américas<sup>2,3</sup>.

De acordo com Limeira *et al.* (2019)<sup>4</sup> as doenças parasitárias conhecidas como leishmanioses, podem ser causadas por mais de 20 espécies diferentes de *Leishmania spp.* Sua transmissão ocorre através da picada de um flebotomíneo. Já são conhecidos quatro tipos variáveis desta doença: leishmaniose visceral (ou kala-zar), leishmaniose dérmica (pós kala-zar), leishmaniose cutânea ou tegumentar e leishmaniose mucocutânea.

Tendo sua forma mais comum a Leishmaniose Cutânea (LC) define-se por lesões na pele, sendo uma ou várias, com maior frequência nas partes expostas do corpo<sup>1</sup>. Dentre os tipos, a mais grave a Leishmaniose

Visceral (LV) é de evolução crônica que pode afetar o corpo inteiro, prejudica tanto o homem quanto os animais, sendo o principal hospedeiro o cão. Tanto a LC quanto a LV são de zoonoses e são um relevante problema de saúde pública<sup>5</sup>.

Nas Américas, as leishmanioses têm uma vasta disseminação geográfica e grande incidência atingindo principalmente os países mais pobres e menos desenvolvidos, avançando como um problema sanitário, para manter o desenvolvimento organizado das ações de vigilância, controle e prevenção dessas doenças exigirá um enorme empenho operacional, científico além de governamental. Presente em 98 países, o controle das leishmanioses e o programa de vigilância epidemiológica é fundamentado na constatação de casos, associado a outras ações de educação na saúde<sup>1</sup>.

Os cães são os principais animais domésticos afetados, sendo os mesmos os reservatórios e hospedeiros parasitários principais, onde a maior concentração está em áreas urbanas, assim também se torna um risco para as pessoas que vivem nas redondezas<sup>4</sup>. No entanto, outros animais também podem hospedar o parasita como, gatos e cavalos. Em alguns países, foram relatadas infecções em bovinos, no Brasil também há relatos, até mesmo em locais não endêmicos<sup>6</sup>.

O êxito do diagnóstico do e tratamento da doença depende dos conhecimentos sobre a epidemiologia e os exames complementares para sua confirmação. Existem diversos exames e testes empregados no diagnóstico da LC e LV. São empregados exames parasitológicos, imunológicos, moleculares e de imagem, de acordo com as necessidades específicas de cada caso<sup>7</sup>.

O objetivo desta revisão é descrever os tipos de diagnóstico laboratorial diferencial da Leishmaniose Cutânea e Visceral, o exame parasitológico, o imunológico, o citológico/histológico e o exame molecular.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é uma Revisão de Literatura efetivada qualitativo/quantitativo que resume, analisa sistematicamente, reflete e discute informações sobre um determinado assunto já publicado. Foram coletados 25 artigos, sendo selecionados 19. As seguintes palavras foram usadas como descritores: Leishmaniose cutânea; Leishmaniose visceral; Diagnóstico laboratorial. Como fonte secundária de pesquisa delimitou-se a Bireme (Biblioteca Virtual em Saúde), LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e o Scielo (*Scientific Eletronic Library Online*). Os critérios de inclusão utilizados na busca e seleção dos estudos foram: estudos que contemplem a temática; que sejam disponibilizados integralmente on-line, sem restrições de acessibilidade, publicados em idioma português, no período de 2002 a 2019.

## 3. DESENVOLVIMENTO

### Diagnóstico laboratorial ampliado

Diagnóstico da leishmaniose varia de acordo com os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da doença, e a execução e sensibilidade de cada exame podem variar de acordo com as formas clínicas, o tempo de evolução das lesões e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas<sup>8</sup>. Quando se há o diagnóstico clínico as espécies mais frequentes são *Leishmania infantum*, *Leishmania siamensis* e *Leishmania braziliensis*<sup>4</sup>.

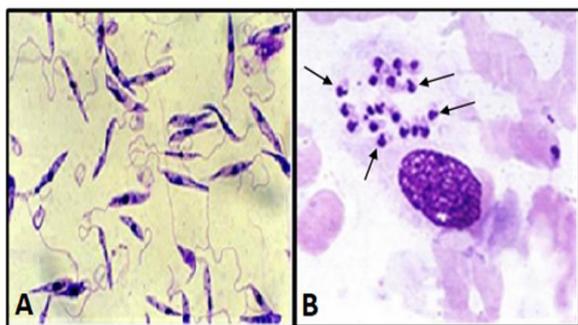
O diagnóstico da Leishmaniose Cutânea é feito em conjunto com análise clínica, epidemiológica e exames laboratoriais, devido sua semelhança com outras doenças, tais como a hanseníase. Na análise clínica é notada a presença de erupções na pele, além de espessamento neural ademais perda de sensibilidade, posteriormente é feita a biópsia de mucosas nasais e pele na região onde se encontra a lesão, coletando então a amostra da borda da lesão e posteriormente corando a partir da técnica de Ziehl-Neelsen, sendo na atualidade considerado padrão ouro. Tendo como diferencial o diagnóstico histopatológico<sup>9</sup>.

Baseado em padrões clínicos e epidemiológicos é realizado o diagnóstico da Leishmaniose Visceral, entretanto enfrenta dificuldades, entre elas a principal é a similaridade com o diagnóstico de outras doenças, tais como esquistossomose. Portanto para a formação do diagnóstico da LV é necessário vincular os métodos clínicos aos imunológicos e parasitológico compondo assim o diagnóstico. O requisito básico para o diagnóstico é localizar o parasita<sup>10, 11</sup>.

### Exame parasitológico

Considera-se o teste de excelência para LV o exame parasitológico. A eficácia desse exame depende diretamente do grau de parasitismo do indivíduo infectado, podendo chegar a 100%. Com base em variadas formas de amostras biológicas, pode-se observar em B (Figura 1) a forma amastigota do parasito, tais como esfregaços de pele, sangue, medula óssea, aspirado de linfonodo, fígado, sangue e baço. A realização da coleta do material para fazer o diagnóstico pode gerar incômodo ao paciente, devido à complexidade de alguns deles. Em seguida, a coleta do material através da punção, as amostras são dispostas em meios de cultura para leishmania com NNN (Neal, Novy, Nicolle) com solução salina estéril ou uma fase líquida de LIT (*Liver Infusion Tryptose*) onde formas amastigota do parasita, existente no material biológico, converte em forma de promastigota em A (Figura 1), após é feita a coloração por Giemsa, Panótico ou Leishman sendo uma forma rápida, simples, além de barata e confiável, sendo capaz de visualizar os parasitos no microscópio. Entretanto, durante o processo da coleta do material havendo a falta de adequação na esterilidade ou na sementeira, poderá ocorrer o crescimento de fungos e bactérias que poderão impedir o crescimento de *Leishmania*,

reduzindo assim, a exatidão do teste<sup>12</sup>.



**Figura 1:** Formas de Leishmaniose., onde (A) apresenta a forma promastigota, em (B) a forma amastigota sendo indicada pelas setas. Fonte: (GONÇALVES, 2018)<sup>12</sup>

### Exame Imunológico

A reação intradérmica realizou-se pela primeira vez em 1926 em Montenegro, sendo o antígeno feito em forma de cultura de *Leishmania* spp., este teste ainda é bastante usado e é denominado Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM). O procedimento consiste na injeção de 0,1ml de antígeno padronizado com a concentração de 40mg de nitrogênio proteico por ml, aplicado na face flexora do antebraço. Quando na leitura de 48 a 72 horas for detectado endurecimento igual ou superior a 5mm, a reação é tida como positivo. O teste torna-se positivo por volta de quatro meses depois do início do ferimento cutâneo, mas não comprova se a doença recente ou passada, nem diferencia infecção de doença, sendo normalmente negativo nos pacientes imunodeprimidos e nas formas cutâneas difusas. O teste de IDRM tem grande importância nos casos em que os parasitas não estão presentes ou em pequenas quantidades, além de ser muito útil em áreas endêmicas e nas averiguações epidemiológicas<sup>13</sup>.

Reações sorológicas: O mais utilizado dentre os métodos sorológicos é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), é uma técnica que se percebe com clareza, porém pode ser confundida com algumas doenças, como a Doença de Chagas. Frequentemente negativa na Leishmaniose Cutânea Difusa, sua sensibilidade é em torno de 100% do tipo mucosa e 71% do tipo cutânea localizada. É constante a negatividade sorológica em paciente com lesões recentes (de um a seis meses de evolução). Nos casos positivos, naqueles que tem múltiplas lesões, os títulos médios são de modo consideravelmente mais elevados, destacando a maior antigenicidade induzida pelo maior número de parasitas. Ademais, é maior o número de reações sorológicas negativas dentre o exame parasitológico positivo no momento que comparado àqueles em que a pesquisa direta do parasita indica negativa<sup>14</sup>.

### Exame molecular

São utilizadas técnicas de biologia molecular para diagnosticar infecção por *Leishmania* a fim de quantificar a carga de DNA do parasita em amostras

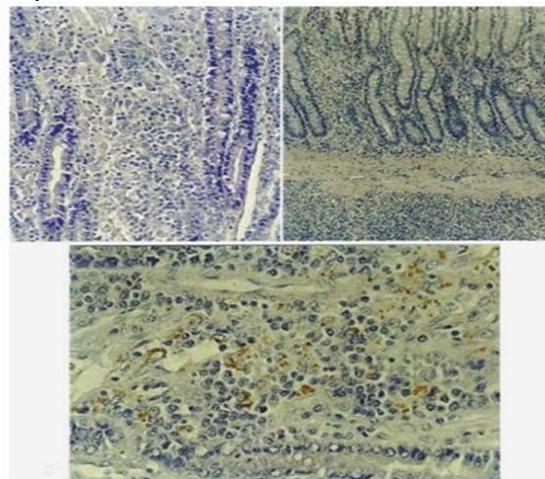
clínicas do sangue do paciente através do exame Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta metodologia consiste na separação de uma região do DNA do parasita, em seguida e feito um molde do mesmo para os iniciadores utilizados durante o PCR, deste modo, o teste garante uma maior taxa de sensibilidade ao parasita<sup>15</sup>.

Para a leishmaniose é usado um composto de moléculas chamadas de mini círculos, com tamanho de 0,5-1,5kb e são empregados nas metodologias moleculares de diagnóstico<sup>16</sup>. Além disso, como forma de diagnóstico pode-se ser usado um cultivo microbiológico das cepas em forma de promastigotas utilizando em meio ágar-sangue. Há também análise do genoma do parasita em amostras biológicas<sup>17</sup>.

### Exame de imagem citológico e histológico

Para um diagnóstico fácil, pelo exame direto, na forma de LCD, é o exame citológico. Permitindo no esfregaço ver inúmeros amastigotas no interior de macrófagos ou livres (Figura 2). Com isso, é de vital importância realizar o estudo anatomopatológico para dar o resultado, e fazer o diagnóstico diferencial entre outros gêneros de Leishmaniose. É necessário prestar uma ligação aos achados histológicos, levando em conta o quadro clínico e imunológico do paciente, para assim fazer a diferenciação da LCD polar da subpolar e dimorfa. Para que a histologia não gere problemas no diagnóstico diferencial, é preciso biopsias das lesões mais excessivas, esquivando-se das lesões em evolução. É sugerido que continuamente seja avaliado biopsias de lesões em ação<sup>18</sup>.

O diagnóstico diferencial da LCD é um indicativo da quantidade parasitaria no teste direto e histopatológico. As lesões de LCD podem por outro lado apresentar infiltração linfoplasmocitária e menor fluxo de macrófagos parasitados, especialmente quando estão em involução espontânea ou perante ação de tratamento imunológico. Também pode ser verificado, proliferação vascular nas lesões evoluídas. Em todo caso, o diagnóstico diferencial deve embasar se também, na avaliação clínica e na história pregressa do paciente<sup>19</sup>.



**Figura 2:** Imagem de diagnóstico citológico e histológico. Fonte: (SILVA, 2002)<sup>18</sup>.

O exame histopatológico tem pontos que precisam ser vistos com mais importância para denominar formas de LC que são a frequência do parasitismo e a presença ou ausência de reação granulomatosa. A todo o momento, é essencial fazer a cultura do material obtido nas lesões desses pacientes, na razão de isolar o parasita e identificá-lo. A identificação do parasita pode assim como “in situ”, em cortes de blocos de parafina de biópsias fixadas em formol, formando-se a imunomarcada com anticorpos anti-L<sup>18</sup>

#### 4. CONCLUSÃO

A leishmaniose é considerada uma zoonose que tem um aumento gradativo, pelo fato de o saneamento básico ambiental ser ainda muito deficiente. O seu diagnóstico pode ser variado. Tanto a LC quanto a LV por serem semelhantes com outras patologias, são necessários que os diagnósticos necessitam ser feito em conjunto com análise clínica, epidemiológica e exames laboratoriais, podendo variar de acordo com as formas clínicas, o tempo de evolução das lesões e as diferentes espécies de leishmania.

Os estudos mostram que os exames de maior eficácia no diagnóstico foram os exames parasitológico que é considerado o teste de excelência para a LV e ainda tem as vantagens de ser um exame rápido, simples, barato e confiável e o exame citológico e histológico para o LC, onde temos um diagnóstico fácil, pelo exame direto. Apesar de o exame parasitológico e o de imagem serem as melhores formas de diagnosticar, não se exclui que os exames imunológicos, como o IDR e o RIFI e o exame molecular, o PCR também são boas formas de diagnosticar.

#### 5. REFERÊNCIAS

- [1] Honório, Isabel de Melo Honório, et al. "Qualidade de vida em pessoas com leishmaniose cutânea." *Revista Brasileira em Promoção da Saúde* 29.3 (2016): 342-349.
- [2] Meirelles, Maria Helena de Athayde, et al. "Preferência de criadouros do flebotômio *Lutzomyia longipalpis* e seu possível papel na transmissão de *Leishmania*." (2018).
- [3] Lopes, Uélio de Lima. *Leishmaniose visceral canina: relato de caso*. BS thesis. Brasil, 2019.
- [4] Limeira, Clécio Henrique, et al. "Clinical aspects and diagnosis of leishmaniasis in equids: a systematic review and meta-analysis." *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 28 (2019): 574-581.
- [5] Alves, Wanessa Alexandra, and Darises Soares Fonseca. "Leishmaniose visceral humana: estudo do perfil clínico-epidemiológico na região leste de Minas Gerais, Brasil." *Journal of Health & Biological Sciences* 6.2 (2018): 133-139.
- [6] Vioti, Geovanna, et al. "Molecular detection of *Leishmania* spp. in cattle from Brazil by means of PCR using internal transcribed spacer 1." *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 28 (2019): 303-305.
- [7] Cerutti, Pedro Henrique Pietrzaki et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. *Revista de Patologia do Tocantins*, v. 4, n. 4, p. 55-59, 2017.
- [8] Anversa, Laís, et al. "Human leishmaniasis in Brazil: a general review." *Revista da Associação Médica Brasileira* 64 (2018): 281-289.
- [9] Nascimento, Jessica Juliana do, Priscilla Layanna Bezerra de Carvalho, and Francisca Janaina Soares Rocha. "Diagnóstico histopatológico diferencial entre hanseníase e leishmaniose tegumentar americana em pacientes de um hospital público em Recife-PE." *Revista Brasileira de Análises Clínicas [Internet]* 51.2 (2019): 127-31.
- [10] Souza, Marcos Antônio, et al. "Leishmaniose visceral humana: do diagnóstico ao tratamento." *Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança* 10.2 (2012): 62-70.
- [11] Oliveira, Janaina Michelle de et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. 2010, v. 43, n. 2 [Acessado 12 Outubro 2021] , pp. 188-193. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000200016>>. Epub 20 Abr 2010. ISSN 1678-9849. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000200016>.
- [12] Gonçalves, Luiz Fernando Camargo Teixeira. Validação do diagnóstico molecular da leishmaniose visceral e da leishmaniose tegumentar na rotina diagnóstica de um laboratório de saúde pública, São Paulo, Brasil. Diss. Universidade de São Paulo, 2018.
- [13] Vasconcelos, Jailra Maria, et al. "Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento." *RBAC* 50.3 (2018): 221-7.
- [14] Gontijo, Bernardo e Carvalho, Maria de Lourdes Ribeiro de Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online]. 2003, v. 36, n. 1 [Acessado 9 Outubro 2021] , pp. 71-80. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>>. Epub 22 Abr 2003. ISSN 1678-9849. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>.
- [15] Oliveira-Pereira, Yrla Nívea, et al. "Diagnóstico molecular da taxa de infecção natural de flebotômios (Psychodidae, Lutzomyia) por *Leishmania* sp na Amazônia maranhense." *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39 (2006): 540-543.
- [16] Pereira-Chioccola, Vera Lucia. "Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo." *BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online)* 6.68 (2009): 4-13.
- [17] Quaresma, Patrícia Flávia. Diagnóstico molecular da Leishmaniose visceral canina e quantificação da carga parasitária através da reação em cadeia da polimerase. Diss. 2007.
- [18] Silva, F.L. et al. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*: a case report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* [online]. 2002, v. 54, n. 4 [Accessed 9 October 2021] , pp. 340-344. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352002000400002>>. Epub 16 Dec 2002. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352002000400002>.
- [19] Bittencourt, Achilêa Lisboa. "Aspectos histopatológicos e ultra-estruturais da leishmaniose cutânea difusa (LCD)." *Gazeta Médica da Bahia* 79 (2009).