



2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Conhecer a patogenia e as manifestações clínicas das diferentes leishmanioses é muito importante para que profissionais de saúde reconheçam ou suspeitem de um caso da doença. Entretanto, o diagnóstico clínico ou a suspeita da doença deve sempre ter confirmação pelo diagnóstico laboratorial.

As abordagens laboratoriais utilizadas para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar são variadas e dependem de vários fatores: tipo de lesão apresentada pelo paciente, estrutura laboratorial e profissionais disponíveis, localização das lesões, entre outros. O profissional médico é quem vai identificar e solicitar a melhor prova diagnóstica a ser realizada para cada paciente.

No entanto, os testes precisam apresentar características relevantes para serem de fato efetivos e auxiliarem o médico e o paciente. A lista abaixo apresenta as características desejáveis em um teste diagnóstico ideal, bem como as características que um pesquisador avalia quando estuda um teste para diagnóstico de doenças.

O teste diagnóstico ideal

- Resposta correta: **positivo** nos indivíduos doentes e **negativo** nos indivíduos não-doentes;
- Rápido;
- Seguro;
- Simples;
- Inócuo;
- Confiável;
- De baixo custo.



O que avaliar em um diagnóstico?

- Reprodutibilidade (repetibilidade);
- Acurácia (exatidão, precisão);
- Especificidade (capacidade de ser específico);
- Valores preditivos (avaliação da eficácia de um teste diagnóstico);
- Razão de verossimilhança (avaliação do desempenho de um teste diagnóstico).

Levando-se em conta:

- Prevalência da doença em estudo;
- Possíveis erros do teste (sistemático e aleatório);
- Vieses (amostral, mensuração e publicação);
- Utilização em série ou em paralelo.

2.1. Diagnóstico parasitológico da leishmaniose tegumentar

Uma das formas de se diagnosticar a LT, por laboratório, é através do diagnóstico parasitológico.

O diagnóstico parasitológico permite a identificação visual da *Leishmania*, baseado no exame ao microscópio de secreções e fragmentos de tecido. Os métodos parasitológicos possuem a grande vantagem de apresentar elevada **especificidade analítica**.

Na LT, os parasitos encontram-se, principalmente, no interior de células do sistema imune que estão na pele, os macrófagos. Por isso, quando o médico considera que a ferida de um paciente pode ser LT, ele o encaminha para um serviço de referência do SUS, onde serão realizados os exames específicos, visando à visualização do parasito ou de partes dele. Pode ser através de:

- **Biópsia** – Retirada de um fragmento mínimo de lesão tanto para visualização após impressão em lâmina de microscopia (“imprint”), como para inclusão em



parafina para exame histopatológico e imuno-hisquímico após colorações específicas, diagnóstico molecular, como também para cultura e isolamento de parasitos multiplicados no meio de cultura. O conjunto desses métodos pode levar à determinação de gênero e espécie da *Leishmania* até variantes e subvariantes da espécie;

- **Escarificação** – Retirada de células e exsudato inflamatório da lesão (secreção da lesão) com um bisturi (lâmina de uso ambulatorial), sem provocar sangramento;
- **Aspirado do tecido da borda das lesões (punção aspirativa)** – O material coletado é destinado a exame de cultura, para isolamento do parasito, sendo semeado em meio de cultura onde deve se multiplicar, para posterior observação em microscópio e submissão a métodos bioquímicos de identificação de gênero e espécie.

Vamos entender um pouco mais sobre cada uma dessas técnicas?

“Imprint” por aposição (carimbo) e esfregaço por escarificação em lâmina.

Na técnica do “imprint”, o fragmento de pele retirado da ferida é utilizado para “carimbar” lâminas de vidro de microscopia (Figura 20). O que limita a utilização da técnica de “imprint” é a necessidade de um ambiente ambulatorial e uso de anestésicos para a realização da biópsia. Este procedimento só pode ser realizado por médicos e dada a ausência desses profissionais treinados em diversas localidades do Brasil, isso se torna um importante limitador. Já o esfregaço por escarificação em lâmina é uma técnica que apresenta inúmeros pontos positivos. Nessa técnica um bisturi é utilizado para escarificar, levemente, a lesão procurando retirar apenas a secreção sem provocar sangramento. O material coletado é



espalhado em uma lâmina de vidro. É uma técnica barata, de fácil manipulação, podendo ser realizada por diferentes profissionais de saúde como enfermeiros, técnicos de enfermagem e de análises clínicas, desde que bem treinados.

Após coleta do material “imprint” ou escarificação, as lâminas seguem para coloração porque as células não possuem coloração suficiente para serem vistas ao microscópio. Por isso, antes da visualização é necessário corar essas lâminas.

Você conhece a estrutura básica de uma célula?

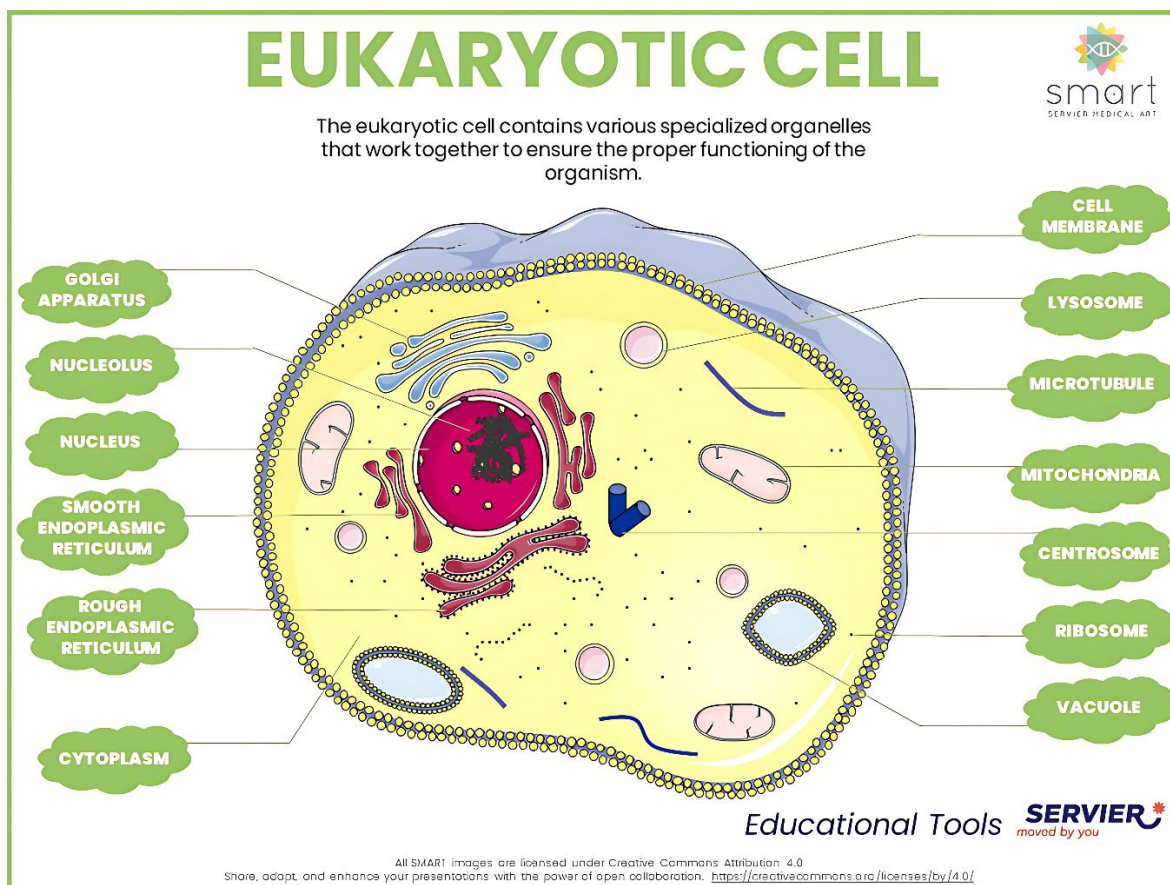


Figura 20. Representação esquemática de uma célula eucariótica, destacando suas principais estruturas: núcleo (contendo o material genético) e nucléolo (responsável pela produção de ribossomos); ribossomos (síntese de proteínas); retículo endoplasmático (rugoso e liso, para síntese



e transporte de proteínas e lipídios); complexo de Golgi (processamento e distribuição de moléculas); mitocôndrias (produção de energia); lisossomos (digestão intracelular); vacúolo (armazenamento de substâncias); centríolo (organização dos microtúbulos e participação na divisão celular); membrana plasmática (delimitação e controle de trocas com o ambiente); citoplasma (matriz que abriga as organelas); e citoesqueleto (suporte estrutural e movimentação celular).

Mas como essa coloração é realizada?

Esta coloração é realizada com corantes líquidos que permitem distinguir os limites celulares, o núcleo e o citoplasma. Na leitura das lâminas o profissional procura identificar as formas amastigota (Figura 21), do parasito. Você se lembra da morfologia de uma amastigota, não é demais reforçar né?

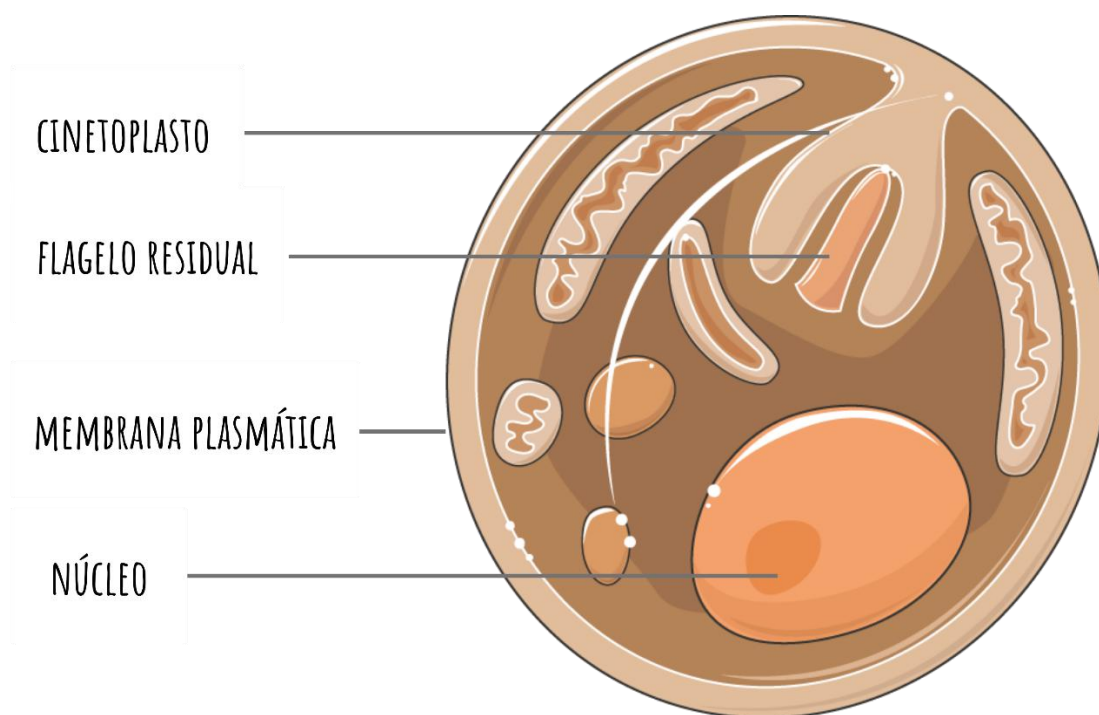


Figura 21. Esquema representativo da morfologia de uma amastigota, forma intracelular de parasitos do gênero *Leishmania*. Destaca o núcleo, o cinetoplasto (estrutura mitocondrial com DNA circular), a membrana plasmática (delimitando a célula), e o flagelo residual não externo, característico desta forma evolutiva. A amastigota é adaptada para sobrevivência no interior de macrófagos do hospedeiro mamífero. **Fonte:** SmartServier licenciada [CC-BY-4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



O esquema abaixo resume o procedimento:

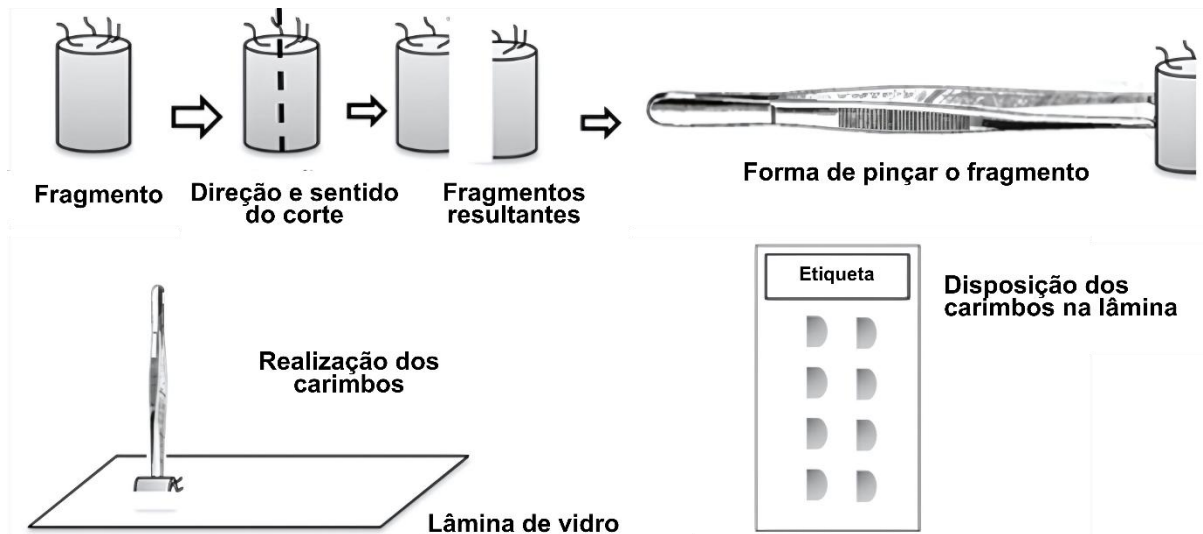


Figura 22. Procedimento de “imprinting”: demonstração do fragmento de tecido, direção e sentido do corte, fragmentos resultantes, forma correta de pinçar o fragmento, técnica para realizar os carimbos e a disposição final dos carimbos na lâmina. Este material é disponibilizado como recurso educacional aberto, destinado a fins acadêmicos e científicos. **Fonte:** os autores.

A visualização de apenas uma amastigota com as estruturas e contorno de membrana, núcleo e cinetoplasto, é suficiente para fechar o diagnóstico. No entanto, é necessário um profissional muito bem treinado para a leitura das lâminas. Resultados falso-positivos representam um grave risco para os pacientes, pois farão com que ele seja tratado desnecessariamente, com medicamentos muito tóxicos.

É importante dizer que a **sensibilidade analítica** da técnica é variável, pois depende de vários fatores, como a espécie de *Leishmania* presente, o local de coleta do fragmento na ferida, o tempo de evolução da ferida, uma vez que lesões recentes, com menos de 6 meses de evolução, apresentam elevada quantidade de parasitos e, como já mencionado, a experiência do microscopista.

Técnica de cultura de fragmento de biópsia e de cultura de aspirado de lesão

Nesta técnica, o fragmento obtido da biópsia, ou parte dele, é cortado em pequenos pedaços e colocado em tubos contendo um **meio de cultura** onde as formas amastigotas (sem flagelo) se transformam em promastigotas (com flagelo), para se



avaliar se haverá o crescimento de *Leishmania*. Se houver multiplicação do parasito, significa que ele estava presente na lesão.

Você sabe o que é um meio de cultura?

Assista ao vídeo Promastigotas de *Leishmania tropica* em meio NNN clicando no ícone de vídeo:



Os tubos contendo meio de cultura são manipulados em cabines de segurança biológica e acondicionados em estufas próprias para o cultivo de parasitos. No meio de cultura, as formas amastigotas se transformam em promastigotas.

Lembra do ciclo? Se necessário, recorde!

As promastigotas apresentam movimentação ativa e utilizam o flagelo para deslocar as células. Uma curiosidade é que o flagelo está à frente do movimento, como que puxando as células, e não atrás como uma hélice de navio.

Observe com atenção o movimento dos parasitos!



Outra técnica em que é utilizada juntamente com meio de cultura é a cultura de aspirado de lesão. Pode ser realizada com seringa contendo soro fisiológico e agulha que é introduzida na borda da lesão, injetando soro fisiológico e aspirando restos de tecido e inoculando o aspirado em tubo convencional de cultura. Uma técnica inovadora quanto à biossegurança é a punção aspirativa à vácuo (Figura



23). Nesta técnica o meio de cultura é colocado em um tubo de coleta de sangue com tampa plástica. Através de uma seringa, perfura-se a tampa plástica e é feito vácuo no interior do tubo coletor. Posteriormente, com o suporte do canhão é realizada a inserção da agulha nas bordas da ferida. Quando o canhão é totalmente encaixado e a agulha perfura a tampa plástica do tubo, o vácuo promove a aspiração da secreção da ferida.

Esta técnica de coleta foi desenvolvida por pesquisadores brasileiros, da Fiocruz, e apresenta grande praticidade na coleta não invasiva de material para diagnóstico da LT.

Observe a praticidade!

Tubo de coleta a vácuo com meio NNN e solução salina com antibiótico

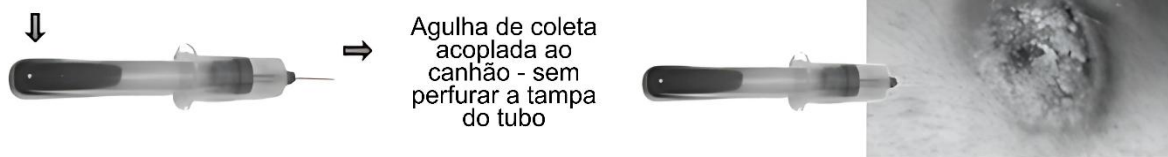


Figura 23. Procedimento de coleta de amostra clínica para diagnóstico de leishmaniose. Ilustração do uso de um tubo de coleta a vácuo contendo meio NNN e solução salina com antibiótico. A agulha de coleta é acoplada ao canhão sem perfurar a tampa do tubo. A imagem à direita representa uma lesão cutânea, possível local de coleta da amostra.

Essas técnicas (Figura 23) apresentam algumas desvantagens, como o alto custo, contaminações frequentes, além de serem trabalhosas e necessitarem de profissional treinado. Da mesma forma, apresentam sensibilidade baixa, o que, por vezes, torna seu uso questionado.

As técnicas de cultura são pouco utilizadas na rotina do diagnóstico, no entanto, são de extrema importância na pesquisa. As técnicas de cultura permitem o crescimento de grande número de parasitos para uso em estudos, por exemplo, para infecção de cobaias (estudo *in vivo*), para desenvolvimento e teste de medicamentos, vacinas e



estudos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de fármacos, assim como testes moleculares para classificação taxonômica dos parasitos.

Um detalhe! Foi possível compreender a diferença entre estudos *in vivo* e *in vitro*? Será que vale conferir no glossário?

Demonstração prática do método indireto – isolamento

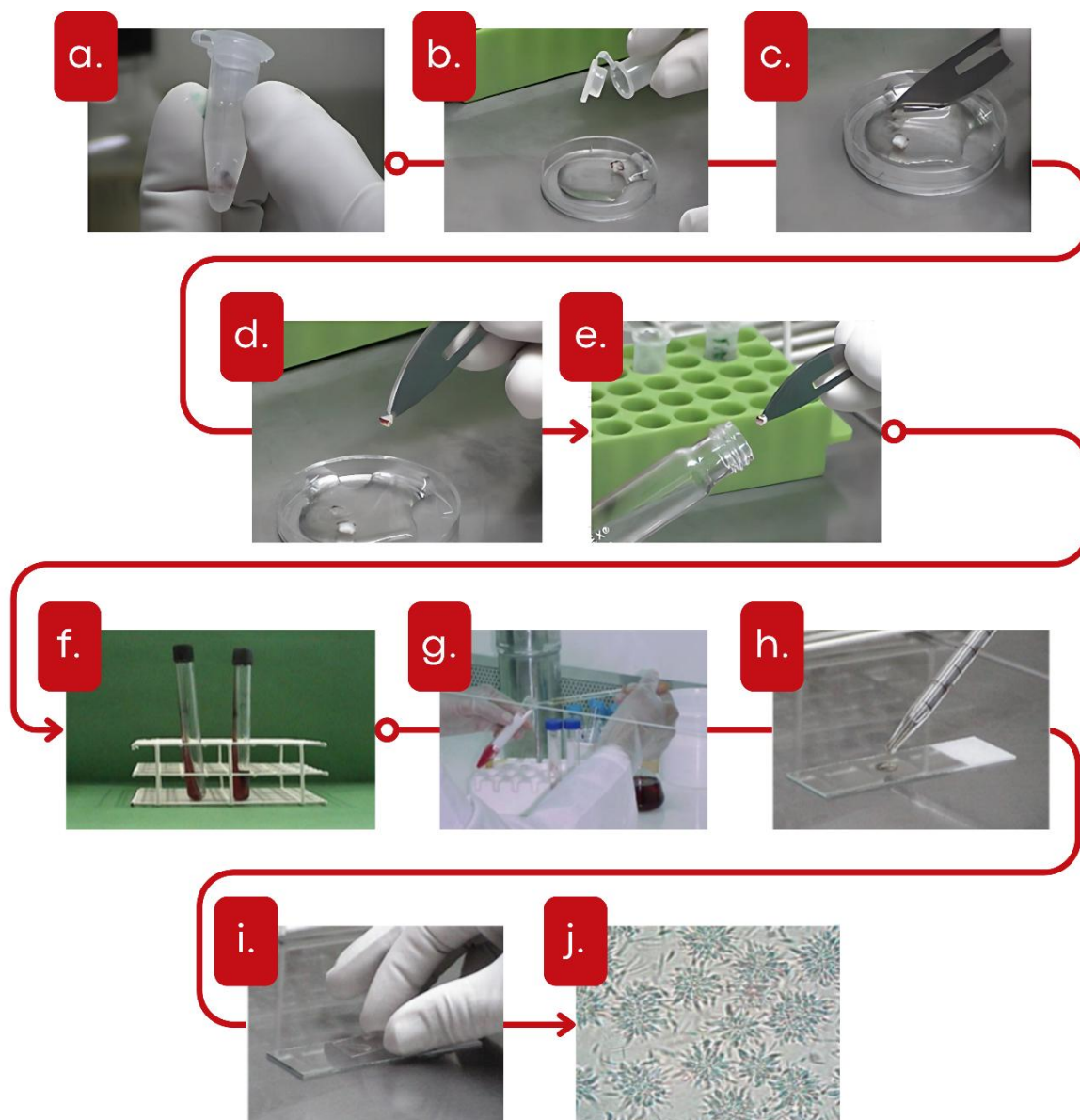


Figura 24. Demonstração prática do método indireto para isolamento de *Leishmania*. Sequência das etapas laboratoriais do procedimento de isolamento da *Leishmania*, abrangendo coleta,



processamento e cultivo do material biológico. (a) Amostra biológica armazenada em tubo. (b) Transferência da amostra para placa de Petri. (c) Fragmentação do material com auxílio de bisturi. (d) Manipulação do fragmento biológico com pinça. (e) Transferência do fragmento para tubo de cultura. (f) Incubação dos tubos com meio de cultivo. (g) Processamento adicional do material biológico. (h) Preparação da lâmina para análise microscópica. (i) Fixação da amostra na lâmina. (j) Observação de formas parasitárias ao microscópio. **Fonte:** os autores.

2.2. Diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar

O principal método de diagnóstico molecular da LT é a reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) que consiste na amplificação *in vitro* de material genético do parasito (sequências de DNA ou RNA). A grande vantagem da PCR é sua capacidade de detectar DNA de *Leishmania* mesmo em lesões mais antigas, com mais de 6 meses de evolução, onde tem poucos parasitos. Na PCR convencional (PCRc) a amplificação do material genético do parasito é visualizada a partir de eletroforese em gel. Já na PCR em tempo real (RT-PCR), pode-se fazer o acompanhamento em tempo real da amplificação e quantificação do material genético do parasito, dispensando a eletroforese. Nesse caso usa-se sondas fluorescentes associada com um equipamento conhecido como termociclador com sensor para captação da fluorescência gerada.

O material genético de *Leishmania* mais utilizado no diagnóstico molecular é a sequência do DNA do cinetoplasto (kDNA). Para identificação das espécies tem sido utilizada a análise de isoenzimas de *Leishmania* e a análise de polimorfismo genético a partir da PCR-RFLP. A análise por isoenzimas é baseada na variação na mobilidade eletroforética de enzimas isoladas de *Leishmania*. A técnica PCR- RFLP é considerada como uma boa alternativa para a caracterização das espécies de *Leishmania*, por ser menos trabalhosa e ter resultados mais rápidos.

As amostras utilizadas no diagnóstico molecular da LT são obtidas, geralmente, por procedimentos invasivos, através de biópsia da lesão. Recentemente, métodos não invasivos de coleta de amostras, como o uso de *swab* (tipo cotonete), estão sendo avaliados e os estudos estão demonstrando bons resultados. A utilização de



técnicas de coleta não invasiva possui a vantagem de ser de fácil execução e proporcionar maior conforto para os pacientes.

2.3. Sistema Único de Saúde x Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar é integralmente atendida pelo SUS – Sistema Único de Saúde, desde o diagnóstico até o tratamento e seguimento pós cura. As instâncias do SUS envolvidas em cada etapa de atendimento são:

- Unidades de atenção primária, onde o paciente é avaliado em consulta médica/enfermagem, na qual será feita anamnese e avaliação de possíveis lesões cutâneas ou mucosas;
- Consulta com especialista (dermatologista e/ou otorrinolaringologista), caso exista a suspeita de LT. Esses profissionais médicos são habilitados e experientes para coleta de biópsias, caso necessário, prescrição de medicamentos e solicitação de outros exames complementares.

Caso o diagnóstico seja positivo, o paciente é tratado, com medicamentos específicos também fornecidos pelo SUS, gratuitamente. O médico irá orientá-lo para a melhor conduta durante e após o tratamento.

VOCÊ SABIA

A leishmaniose tegumentar é **Doença de Notificação Compulsória**, ou seja, é obrigatório informar o caso, e o Sistema de notificação dessas doenças também é gerido pelo SUS, bem como o sistema de controle e distribuição de medicamentos e demais insumos necessários para o atendimento a esta doença.

Todos os exames adotados pelo SUS passam por extensa avaliação científica e estão disponíveis para todo o país, sem custos para os pacientes.

Em caso de dúvidas, procure o Serviço Social em suas Unidades de Atendimento, eles poderão orientá-lo especificamente sobre suas necessidades e direitos quanto ao atendimento.

