

## PANORAMA HISTÓRICO DO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (MÉTODOS PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS)

Aparecida Helena de S. GOMES – Centro de Laboratório Regional de Sorocaba – Núcleo Ciências Biomédicas – Instituto Adolfo Lutz. cidahelena@ial.sp.gov.br

### Resumo

O presente estudo faz uma retrospectiva histórica do diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana. O exame parasitológico direto é realizado a partir de esfregaços de diferentes materiais biológicos como raspados e aspirados de lesão, fixados e corados pelo corante de Giemsa e que, desde 1930 até os dias de hoje, é utilizado e considerado como padrão ouro. Os testes imunológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e os testes imunoenzimáticos (ELISA), desenvolvidos nas décadas de 60 e 70, apresentam reações cruzadas ou falsos negativos, comprometendo a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes frente aos baixos títulos de anticorpos observados no início e evolução da LTA. A intradermorreação de Montenegro, utilizado pela primeira vez por J. Montenegro em 1924, usou extratos de *Leishmania brasiliensis* mortas. O teste traduz a resposta de hipersensibilidade tardia, é de grande valor presuntivo, revelando se houve contato anterior do parasita com o paciente e que envolve um conjunto de fatores que estão relacionados à resposta humoral. O teste de Montenegro é de grande utilidade e praticidade, especialmente em pesquisas epidemiológicas, nos estudos de incidência e prevalência, mas deve ser analisado com cautela devido a sua baixa especificidade. A Reação em Cadeia da Polimerase foi empregada nos anos 80, com resultados inovadores, alta sensibilidade, contudo, em virtude do elevado custo operacional da época, não foi adaptada ao diagnóstico de rotina. Atualmente constitui-se o teste de maior sensibilidade e especificidade, quando comparado aos métodos tradicionais, visto que as técnicas moleculares já estão bem estabelecidas. Apresentam custo benefício viável e ao alcance de muitos laboratórios, permitem além de detectar o DNA do parasito do gênero *Leishmania*, também, identificar a espécie específica envolvida na infecção, contribuindo com estudos epidemiológicos relevantes para compreensão da transmissão, diagnóstico, tratamento e controle da doença.

**Palavras-chave.** história; leishmaniose tegumentar americana; diagnóstico parasitológico e imunológico.

### Introdução

As teorias sobre a origem e difusão das leishmanioses evoluíram principalmente durante as eras bacteriológica e epidemiológica. Na metade do século XV, os primeiros microscópios foram construídos e eram utilizados inicialmente para investigar o mundo dos insetos, possibilitando assim a descoberta de microrganismos e agentes de doenças<sup>3, 8, 11, 12</sup>.

Essa descoberta refletiu um enorme significado médico-social no mundo todo, passando o homem a crer na existência de agentes etiológicos e não simplesmente no paradigma da existência do miasma, interferência do meio ambiente e a teoria dos germes.

No Brasil, a história parasitologia começa a partir da criação da Sociedade de Medicina e Cirurgia no Rio de Janeiro (1829) e da Escola Tropicalista Baiana com a investigação das doenças tropicais como a filariose, a ancilostomíase e a malária (1866).

Em 1902, com a criação do Instituto de Manguinhos, posteriormente designado Instituto Oswaldo Cruz, novas doenças foram descobertas como a tripanossomíase americana ou doença de Chagas, febre amarela, peste e as leishmanioses cutâneo-mucosas.

Em 1908 na Santa Casa de São Paulo já era realizado o diagnóstico de numerosos casos de leishmaniose tegumentar que, na época, recebia várias denominações como úlcera de Bauru, ferida brava, úlcera do Noroeste e outras. Ainda não se conhecia a etiologia da doença. Foi quando em 30 de março de 1909, Adolfo Lindenberg notificou a descoberta do parasito, identificando o agente causal da úlcera de Bauru.

## Métodos Parasitológicos

A partir de 1911 muitos pesquisadores dedicaram seus estudos para o isolamento do parasito em meios de cultivo (*in vitro*) e em diferentes animais como camundongos, cães, cobaias, macacos e outros (*in vivo*), inoculando-os com material contendo *Leishmania* provenientes de úlceras de pacientes. Desta forma a microscopia revelou as formas, uma flagelada, a promastigota observada no tubo digestivo do inseto vetor infectado (*Lutzomyia*, Diptera, Psychodidae) e nos meios de cultura, e a forma amastigota que se encontra nos tecidos (macrófagos) dos animais infectados, inclusive o homem. O exame parasitológico direto é, até hoje, utilizado e continua sendo considerado como o exame *gold standart*<sup>2, 8</sup>.

A técnica de coleta desses materiais requer prática, seja da escarificação da lesão, de aspirados de gânglios ou biopsias de pele. Estes materiais podem ser distendidos em lâmina, fixados e corados pelo Giemsa ou semeados em meios de cultivo acelulares ou inoculados em animais susceptíveis.

O exame parasitológico direto apresenta especificidade e sensibilidade, entre 60% e 95%, é prático e de baixo custo. Entretanto é imprescindível mencionar que a positividade do método é proporcionalmente inversa ao tempo de lesão, ou seja, quanto mais antiga a lesão os parasitos tornam-se menos abundantes, diminuindo as possibilidades de encontrá-los. Infecções secundárias por bactérias e fungos também podem alterar o aspecto da lesão, prejudicando o encontro e a visualização do parasito. O isolamento da *Leishmania* em meios de cultivo pode ser feito a partir de materiais obtidos na lesão, gânglios e outros tecidos, mas pode ser prejudicado pelos altos índices de contaminação<sup>8, 14, 15, 16</sup>.

O método parasitológico direto não permite a identificação e caracterização da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, pois morfologicamente elas são semelhantes e é importante mencionar que, em determinadas regiões, existem duas ou mais espécies circulando simultaneamente, que diferem entre si quanto à forma clínica da doença e a resposta terapêutica.

## Métodos Imunológicos

A reação intradérmica de Montenegro foi introduzida na prática médica com a finalidade de auxiliar no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)<sup>1, 3, 5</sup>. O teste foi utilizado no diagnóstico da LTA pela primeira vez por J. Montenegro em 1924, mas só foram publicados em 1926. Montenegro usou extratos alcalinos de *Leishmania brasiliensis*; mais tarde, verificou-se que os extratos continham partículas do parasito, desta forma, passaram a ser usadas suspensões de *Leishmania* mortas e, mais recentemente, quebradas por meio de ultrassom<sup>1, 5, 6</sup>. O teste de Montenegro traduz a resposta de hipersensibilidade retardada, de grande valor presuntivo, sendo positivo em torno de 95% dos casos de LTA, porém, pode apresentar-se negativo nos quatro meses após o início da lesão cutânea; assim como na Leishmaniose Visceral, na forma cutânea-difusa da LTA e em pacientes imunodeprimidos<sup>7, 8, 9</sup>.

O teste de Montenegro é altamente sensível (100%), mas apresenta baixa especificidade (60%). Pacientes podem apresentar sensibilidade à solução salina fenolada, utilizada como solvente e conservante no preparo do antígeno<sup>9, 13</sup>. Além disso, pacientes que vivem em regiões endêmicas, ou já tiveram a doença e foram tratados, podem apresentar 97% a 100% de positividade<sup>9, 10</sup>.

De Lima Barros et al. observaram reação cruzada nos casos de infecção e/ou coinfeção por esporotricose, justificando, também, a necessidade da utilização de mais de um método diagnóstico. Portanto, o valor diagnóstico do teste de Montenegro é limitado principalmente em pacientes de região endêmica. Devido a esses fatores de interferência, recomenda-se muita cautela na interpretação dos resultados, visto que é um teste muito solicitado.

Os testes sorológicos como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e os testes imunoenzimáticos (ELISA) desenvolvidos nas décadas de 60 e 70, apresentam reações cruzadas, comprometendo a sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos testes frente aos baixos títulos de anticorpos observados no início e desenvolvimento da LTA<sup>1, 7, 8</sup>. Entretanto, estudos utilizando variações e combinações antigênicas têm despertado grandes expectativas quando utilizados para comparação de títulos de anticorpos, antes, durante e após o tratamento, auxiliando no controle da resposta terapêutica e cura da doença.

## Considerações Finais

Os testes tradicionais não devem ser abolidos, pois compreendem técnicas de fácil execução, baixo custo e que apresentam bons resultados, considerando as diferentes fases da doença.

Tanto o teste de Montenegro quanto ao exame direto, quando positivos, não permitem que seja identificada qual a espécie/específica de *Leishmania* envolvida na infecção, para tanto é necessário que se realize métodos moleculares (PCR e outros) fazendo a extração de DNA da cepa isolada, por meio de cultivo ou do próprio material biológico bruto (fragmentos de pele, aspirados de lesão ou de linfonodo).

A identificação das espécies de *Leishmania* circulantes nas regiões endêmicas pode contribuir com os estudos relacionados à epidemiologia da doença, envolvendo: reservatórios, vetores responsáveis pela transmissão, formas clínicas apresentadas, resposta terapêutica e, principalmente, à possibilidade de produção de antígenos específicos, para melhorar a especificidade e a sensibilidade dos testes imunológicos para o diagnóstico, controle do tratamento da LTA.

## Referências Bibliográficas

1. Faber WR et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. J Am Acad Dermatol. 2003; 49: 70-4.
2. Gontijo CM et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Acta Trop. 2002; 81: 143-50.
3. Da Costa CA et al. Montenegro skin test-evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. Mem Int Oswaldo Cruz. 1996; 91: 193-4.
4. Barros, LMB et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. Acta Trop. 2005; 93: 47-7.
5. Melo MM et al. Padronização de Antígeno de Montenegro. Rev Inst Méd Trop São Paulo, 1977.
6. Altamirano-Enciso AJ et al. Hist Cienc Saúde [ilus, mapas]. set-dez 2003;10(3): 853-882.
7. Nascimento MD et al. Induction and modulation of the immune response to *Leishmania* by Montenegros's skin test. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1993; 87: 91-3.
8. Rey L. *Leishmania* e leishmanioses: os parasitos. In: Rey L. Parasitologia: parasitas e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;1991. 2 ed. p. 182-92.
9. Gomes AHS et al. *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. Experimental Parasitology. 2007; 119: 4894-5.
10. Silveira TG et al. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32: 413-23.
11. Departamento de Protozoologia/ IOC/FIOCRUZ. Laboratório de imunomodulação. As Leishmanioses. [acesso em: 16 dez 2004]. Disponível em: <http://WWW.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishex/index.htm>.
12. Moreira J. Botão endêmico dos países quentes. O Brasil Médico. 1906; 1: 100-1.
13. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Bula de instruções que acompanha o frasco de Antígeno de Montenegro – Seção de produção de reagentes. Biologia Médica. Instituto Adolfo Lutz.
14. Nino A, Camacho M. *Leishmania (Viannia) braziliensis* growth in vitro culture relies more on folic acid availability than *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005; 100(3): 309-310.
15. Warburg A, Gelman S, Deutsch J. Xanthine in urine stimulates growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. J Med Microbiol. 2008; 57(Pt 1): 136-8,.
16. Armstrong TC, Patterson JL. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. J Parasitol. 1994; 80(6): 1030-2.