

## Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas

### Diagnostic Methods of Tegumentary Leishmaniasis: Facts, Fallacies and Perspectives

Bruno B. Andrade<sup>1,2</sup>, Viviane Boaventura<sup>1,2</sup>, Manoel Barral-Netto<sup>1,2,3</sup>, Aldina Barral<sup>1,2,3</sup>  
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ<sup>1</sup>; Faculdade de Medicina da Bahia, UFBA<sup>2</sup>; Instituto de  
 Investigação em Imunologia<sup>3</sup>; Salvador, BA, Brasil

Pesquisas clínicas e laboratoriais recentes têm atentado para os aspectos individuais, entomológicos e epidemiológicos das diferentes manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar. Nas áreas endêmicas, o diagnóstico ideal deve ser realizado na fase inicial da apresentação clínica, para evitar as complicações da doença crônica. A escassez de suporte financeiro, estrutura laboratorial e pessoal especializado representam obstáculos importantes para esta realidade. Investigações diagnósticas tradicionais para casos individuais incluem a pesquisa de uma história sugestiva e características clínicas, a identificação de amastigotas através da histologia ou microscopia direta e testes sorológicos. O diagnóstico através da reação de polimerase em cadeia (PCR) parece representar uma técnica inovadora, tornando possível a rápida identificação de espécies e subespécies. A proposta desta revisão é discutir algumas das mais importantes questões do diagnóstico clínico e laboratorial da leishmaniose tegumentar. A sensibilidade e especificidade dos velhos e novos testes para identificar o parasita, produtos antigênicos, a resposta imunológica do hospedeiro e o diagnóstico molecular por PCR são considerados.

**Palavras-chave:** *Leishmania*, diagnóstico, leishmaniose, Montenegro, PCR.

*Recent clinical and laboratory research has addressed the individual, entomological, and epidemiological aspects of different clinical manifestations of tegumentary leishmaniasis. In endemic areas, diagnosis should ideally be made during the initial phase of the clinical presentation of the disease to preclude complications of chronic disease. The scarcity of financial support, laboratory installations and qualified personnel represent important obstacles to achieving this goal. Traditional diagnostic tools for individual cases include the search for suggestive clinical history and features, the identification of amastigotes by histology or direct microscopy, and serologic tests. Polymerase chain reaction (PCR) seems to represent an innovative diagnostic technique, enabling the fast identification of Leishmania species and subspecies. The purpose of this review is to discuss some of the more important issues related to the clinical and laboratory diagnosis of tegumentary leishmaniasis. The sensitivity and specificity of both old and novel tests used to identify the parasite, antigenic products, the host immune response, and the molecular diagnosis by PCR are all discussed in this paper.*

**Key words:** *Leishmania*, diagnosis, leishmaniasis, Montenegro test, PCR.

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dra. Aldina Barral, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador, BA, Brasil, 40296-710. Tel (+55) 71 3356 8782 r. 215, FAX (+55) 71 3356 8782 r. 261. E-mail: abarral@cpqgm.fiocruz.br

**Gazeta Médica da Bahia** 2005;75(1):Jan-Jun:75-82.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

No Brasil e em muitos outros países subdesenvolvidos, a leishmaniose tegumentar (LT) apresenta-se de forma endêmica e constitui problema de saúde pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas clínicas crônicas que podem determinar lesões desfigurantes e incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo<sup>(14)</sup>.

Portanto, um diagnóstico preciso e precoce da LT é de extrema importância para o tratamento adequado e o controle das possíveis complicações da cronificação da doença. Entretanto, até o momento não se identificou um método “padrão-ouro” para o diagnóstico desta enfermidade. O diagnóstico de LT abrange aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (pesquisa parasitológica e testes imunológicos). Frequentemente, a associação de alguns desses elementos é necessária para se chegar ao diagnóstico final<sup>(21)</sup>. Apesar dos achados clínicos e da história epidemiológica poderem fortemente sugerir a possibilidade de leishmaniose, somente a identificação definitiva do parasita pode confirmar o diagnóstico. Os métodos diagnósticos parasitológicos atualmente utilizados apresentam baixa sensibilidade e desvantagens operacionais nas áreas endêmicas, uma vez que a infra-estrutura ainda é bastante deficitária nessas regiões. Por esta razão, a busca de testes mais eficazes utilizando métodos moleculares tornou-se necessária. Esta revisão pretende expor os métodos utilizados no diagnóstico da LT, avaliando criticamente a eficácia e a aplicabilidade nas áreas endêmicas e adequação ao modelo de assistência vigente no Brasil.

### Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico da LT é sugerido na anamnese e baseia-se nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos do doente (pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente). As leishmanioses apresentam um vasto espectro de manifestações clínicas com envolvimento cutâneo e/ou das mucosas e cartilagens<sup>(8)</sup>. A apresentação da doença é resultado de uma complexa interação entre o vetor, a espécie do parasita infectante e a resposta imunológica do hospedeiro. Assim, a LT abrange desde leishmaniose cutânea localizada (LC) e muco-cutânea (LM), representando o pólo responsivo do hospedeiro, até a forma cutânea difusa (LCD), representante do pólo não responsivo, no qual se evidencia uma baixa resposta imunológica do hospedeiro. Esta variação da apresentação clínica da LT torna o diagnóstico clínico difícil.

A espécie *Leishmania braziliensis* é a responsável pela maioria dos casos de LT no Brasil<sup>(15)</sup>, sendo a *L. amazonensis* também considerada importante agente causador da doença nas regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste do Brasil<sup>(3,24,29,38)</sup>. Classicamente, a LT é caracterizada por uma úlcera cutânea indolor crônica, com bordas elevadas e fundo granuloso, com ou sem exsudação. A lesão se inicia no ponto de inoculação das promastigotas na epiderme do hospedeiro, através da picada de flebotômíneos do gênero *Lutzomyia* infectados. A lesão primária é, em geral, única, embora eventualmente múltiplas picadas do flebotômíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões<sup>(23)</sup>. O período de incubação é variável e pode oscilar entre 10 dias e três meses, no momento em que surge uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo, antes da ulceração propriamente dita. Acompanha-se de adenopatia regional, com ou sem linfangite, em 12 a 30% dos casos. Três a cinco por cento dos pacientes desenvolvem lesões metastáticas para mucosas<sup>(22)</sup>. Quando causada por parasitas do complexo *L. braziliensis*, a lesão pode curar espontaneamente, pode disseminar ou ainda metastatizar para a nasofaringe, resultando na forma cutâneo-mucosa, mais frequentemente associada a esta espécie de parasita<sup>(19)</sup>. Com a ocorrência dessas metástases, graves lesões desfigurantes e complicações secundárias também podem ocorrer, podendo ser fatal se não adequadamente tratadas<sup>(22)</sup>.

Com a evolução, ganha destaque o notável polimorfismo das lesões, sendo possível encontrar formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante e ectimatóide, o que dificulta ainda mais o diagnóstico. Assim, para o diagnóstico correto, devem ser excluídas as úlceras traumáticas, úlceras de estase venosa, úlceras de membros inferiores decorrentes da anemia falciforme, piodermites, paracoccidiodomicose, esporotricose, cromomicose, neoplasias cutâneas, sífilis, tuberculose cutânea e hanseníase virchowiana, a qual entra no diagnóstico diferencial da leishmaniose cutânea difusa<sup>(8)</sup>. Nas lesões mucosas, o diagnóstico diferencial deve ser feito com a paracoccidiodomicose, hanseníase virchowiana, rinoscleroma, boubá, sífilis terciária,

granuloma médio facial e neoplasias<sup>(22)</sup>. Assim, devido à dificuldade encontrada para o diagnóstico clínico seguro, os métodos laboratoriais fazem parte do arsenal de investigação.

### Diagnóstico Laboratorial

A rotina diagnóstica laboratorial é feita através do exame direto de esfregaços ou impressão por aposição, da análise histopatológica das lesões, de testes sorológicos ou do teste cutâneo com antígenos de leishmania (reação de Montenegro). O diagnóstico definitivo depende da identificação de amastigotas em amostras de tecido coradas com *Giemsa* ou *Leishman*, analisadas à microscopia óptica ou por isolamento de promastigotas em meio de cultura<sup>(8)</sup>. A microscopia direta do esfregaço ou impressão possui uma baixa sensibilidade (50-70%) ao passo que a identificação de granulomas, com ou sem parasitas, na análise histopatológica parece apresentar boa sensibilidade (70-100%)<sup>(40)</sup>. Infelizmente, esses métodos, na melhor das hipóteses, confirmam o diagnóstico de LT sem a especificação da espécie do parasita. A literatura descreve que os casos de LT causados por *L. braziliensis* manifestam-se com uma gravidade clínica maior e apresentam frequente falha ao tratamento convencional<sup>(35)</sup>. Portanto, a identificação da espécie da *Leishmania* infectante traz um valor adicional de fator prognóstico, no momento em que é estimada a resposta clínica à terapêutica a ser instituída. Além disso, um considerável número de casos apresenta uma baixa carga parasitária na lesão, o que resulta em uma baixa sensibilidade desses métodos. A chance de se encontrar o parasita é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão, e a sensibilidade desses métodos nos casos causados por *L. braziliensis*, por exemplo, está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses<sup>(13)</sup>. No caso do Brasil, a detecção precoce é dificultada pela estrutura da assistência deficitária à saúde. Assim, a maioria dos casos de LT, quando identificadas pelos profissionais de saúde, se apresentam na fase crônica. Essas limitações trazem

óbvias implicações para os profissionais envolvidos nas decisões sobre os processos de intervenção terapêutica e ainda criam dificuldades para o estabelecimento de um prognóstico.

A cultura dos promastigotas *in vitro* permite a identificação da espécie presente na lesão. Entretanto, as espécies de *Leishmania* apresentam capacidade de crescimento variável em cultura e esse método requer uma série de condições laboratoriais, pessoal treinado e mais de 10 dias para a aquisição de um número suficiente de promastigotas para as investigações. A sensibilidade global desse método está em torno de 50% para *L. braziliensis*<sup>(27)</sup>. Casos crônicos, como aqueles com baixa carga parasitária na lesão, também resultam em uma sensibilidade ainda mais reduzida desse método. Estas características tornam o método de isolamento do parasita em culturas inadequado para o inquérito epidemiológico em larga escala.

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação de material da biópsia cutânea em animais de laboratório, de preferência hamsters (*Mesocricetus auratus*)<sup>(16)</sup>. Além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses em média) e da necessidade de um laboratório adequado, a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania*<sup>(40)</sup>. Esse método, na verdade, é mais utilizado em laboratórios de pesquisa.

Anticorpos anti-leishmania estão presentes no soro de pacientes com LT e podem ser detectados por teste imunoenzimático (ELISA) ou imunofluorescência indireta (IFI), aglutinação direta e outros ensaios<sup>(14)</sup>. Esses métodos devem ser realizados em centros de referência com pessoal treinado, acarretando em uma aplicabilidade limitada no diagnóstico de um caso de LT em curso, não sendo rotineiramente utilizados na prática clínica. Entretanto, um estudo utilizando ELISA para a detecção de anticorpos IgG e IgM por meio de antígeno solúvel de *L. mexicana* (cepa ATCC 50157) foi descrito em 143 pacientes e 42 cães com LT no Brasil<sup>(36)</sup>. Uma sensibilidade global de aproximadamente 92% foi apresentada por este simples método e os autores sugeriram que este teste tem potencial para ser aplicado nos diagnósticos individuais e epidemiológicos de LT nas regiões endêmicas.

Dentre os métodos sorológicos, a IFI é o mais utilizado. É uma técnica sensível, porém, existe a possibilidade de reações cruzadas, especialmente com o *Trypanosoma cruzi*, agente da doença de Chagas, e com a *L. chagasi*, agente da leishmaniose visceral, ambas as doenças muito prevalentes em áreas endêmicas de LT, causando confusão em termos de diagnóstico<sup>(18)</sup>. Por refletir a resposta do hospedeiro à infecção, a IFI apresenta resultados variáveis na LT, quer pela reduzida antigenicidade do parasita ou pelos baixos níveis de anticorpos circulantes. Na forma cutânea isolada, sua sensibilidade é estimada em 71% e pode alcançar 100% na forma mucosa, na qual a resposta imunológica do hospedeiro é intensa<sup>(26)</sup>. Por outro lado, essa técnica mostra resultados habitualmente negativos na forma cutânea difusa, um reflexo da baixa resposta imunológica encontrada nesses pacientes. Em pacientes imunossuprimidos ou com lesões recentes (um a seis meses de evolução), é freqüente a negatividade sorológica. Quanto aos pacientes com sorologia positiva, os títulos de anticorpos médios são significativamente mais elevados (principalmente o isotipo IgG) naqueles que apresentam múltiplas lesões, refletindo a maior imunogenicidade induzida por uma exposição antigênica mais expressiva<sup>(14)</sup>. Além disso, constatou-se que o número de reações sorológicas negativas é maior entre os que possuem o exame parasitológico positivo quando comparado àqueles em que a pesquisa direta do parasita revela-se negativa<sup>(6)</sup>. Após o tratamento e cura, os títulos podem cair ou desaparecer em alguns meses.

Outras técnicas como o *Western blot* tem sido úteis no diagnóstico de infecções por *L. infantum*, no sul da França<sup>(31,39)</sup>, e o teste de aglutinação direta revelou sensibilidade satisfatória (90,5%) e especificidade (91,8%) em infecções cutâneas por *L. aethiopica*<sup>(17)</sup>.

O teste de intradermorreação de Montenegro tem sua origem descrita em 1926 e ainda hoje é amplamente utilizado, com uma boa aplicabilidade clínica e baixo custo<sup>(8,27)</sup>. Esse teste consiste na injeção intradérmica de um coquetel antigênico padronizado na face flexora do antebraço. Esse coquetel é preparado a partir de componentes

extraídos de culturas de promastigotas de *Leishmania* sp. e apresenta diferentes composições em várias partes do mundo, de acordo com os agentes etiológicos da LT de cada região<sup>(32)</sup>. O teste de Montenegro toma como base o tipo de imunidade anti-leishmania desenvolvida pelo hospedeiro durante a doença ou após a cura da infecção. Essa resposta imunológica é caracterizada por uma hipersensibilidade celular tardia, apresentando infiltrados com predominância de linfócitos e macrófagos no sítio da infecção<sup>(4)</sup>. O que este teste detecta, portanto, é a reação de hipersensibilidade ao antígeno purificado injetado. O resultado é lido 48 ou 72 horas após a realização do teste e expressa um valor positivo quando se detecta uma endureção cutânea local maior que 5mm de diâmetro<sup>(27)</sup>. Possui grande valor no diagnóstico da LT, constituindo valioso recurso diagnóstico nos casos em que os parasitas são escassos ou ausentes, sendo também bastante útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas. Estima-se uma positividade de 84 e 100% nas formas cutânea e muco-cutânea, respectivamente, e resultados negativos na forma cutânea difusa<sup>(37)</sup>. Entretanto, o uso de um coquetel de antígenos favorece a uma significativa ocorrência de reações cruzadas, sendo a especificidade do teste baixa<sup>(25)</sup>. Além disso, o teste de Montenegro se torna positivo em torno de quatro meses após o início da lesão cutânea, mas não diferencia doença atual e pregressa (na maioria das vezes permanece positivo após o tratamento), nem distingue doença de infecção e é habitualmente negativo nas formas cutâneas difusas e nos pacientes imunodeprimidos<sup>(27)</sup>. Assim, a identificação de um teste positivo em um paciente de área endêmica, apesar de possuir importância epidemiológica, é irrelevante para o diagnóstico atual da infecção por leishmania em andamento, como discutido por Medeiros et al.<sup>(25)</sup> no contexto brasileiro.

Finalmente, novos métodos moleculares simplificados de alta sensibilidade e especificidade estão sendo desenvolvidos para o diagnóstico e seguimento terapêutico dos pacientes que podem ser aplicados para o diagnóstico taxonômico espécie-específico.

## Situação e Perspectivas do PCR como Ferramenta Diagnóstica da LT

O diagnóstico definitivo da LT é feito a partir da demonstração da leishmania em amostras de tecido ou por meio de cultura ou inoculação de material extraído de pacientes em animais. Esses métodos são bastante laboriosos e requerem pessoal treinado para sua execução. Além disso, requerem longo intervalo de tempo até a obtenção dos resultados. Em vista dessas dificuldades, novos métodos moleculares foram desenvolvidos <sup>(12)</sup>. Entre eles está a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). De fato, inúmeros ensaios de PCR foram desenvolvidos para a detecção de espécies de *Leishmania* em amostras clínicas <sup>(2,5,10,30,33,34)</sup>. Estes ensaios objetivam a amplificação de genes do RNA ribossomal, de genes de minixon, de DNA do cinetoplasto e de seqüências de DNA repetitivo. Desta maneira, esses ensaios apresentam especificidade diferente: alguns identificam até a espécie do parasita em questão enquanto outros apenas detectam o mesmo na amostra. Esta informação é suficiente para os propósitos de diagnóstico. No entanto, uma maior especificidade pode contribuir diretamente para o entendimento da epidemiologia da leishmaniose.

A PCR é particularmente útil no caso da LT em decorrência da necessidade da confirmação parasitológica diante da possibilidade de tratamento. Além disso, os métodos ditos “convencionais”, como a intradermoreação de Montenegro e a sorologia, apresentam baixa sensibilidade. No caso de LT causada por *L. braziliensis*, a escassez de parasitas na lesão é um dos marcos da infecção, o que torna a confirmação parasitológica ainda mais difícil. Este fato pode ocasionar erros diagnósticos e, conseqüentemente, uma demora do início do tratamento, o que é especialmente preocupante uma vez que a *L. braziliensis* é capaz de se estabelecer em áreas de mucosa, levando à leishmaniose mucocutânea. A detecção precoce do parasita pode prevenir esses casos, permitindo a implementação do tratamento específico de pacientes nas áreas nas quais a *L. braziliensis* é prevalente.

Neste sentido, realizamos um estudo a fim de avaliar a contribuição da PCR no diagnóstico da LT causada por *L. braziliensis* <sup>(11)</sup>. Nossos resultados mostraram que a PCR foi positiva em 100% das biópsias de pele obtidas de pacientes com LT, independente dos resultados obtidos com outros métodos diagnósticos como a sorologia, cultura *in vitro* ou imunohistoquímica. Assim, a PCR apresentou uma positividade de 100%. Essa positividade foi calculada baseada no fato de que todos os pacientes desse estudo apresentaram cura clínica após o tratamento. A cura clínica, por sua vez, foi definida como cicatrização total da úlcera cutânea sem aparição de outras lesões até um ano após o término do tratamento. Embora a cura clínica não possa ser considerada o “padrão-ouro” no diagnóstico da LT causada por *L. braziliensis*, é um forte indicador de que o paciente estava realmente infectado com leishmania.

Nesse estudo, a PCR também se mostrou 100% específica, pois não detectamos o produto de amplificação em biópsias obtidas de pacientes com lesões cutâneas decorrentes de outras enfermidades ou mesmo em biópsias de pele de pacientes normais. A confirmação parasitológica, nesse mesmo trabalho, foi possível em 66% dos casos. No entanto, isto só ocorreu quando utilizamos a técnica de imunohistoquímica, o que confirma a escassez de parasitas nas lesões.

Mais recentemente, realizamos um outro estudo semelhante, onde mostramos que a PCR também é bastante sensível no diagnóstico da leishmaniose mucosa <sup>(28)</sup>. Nesse trabalho, mostramos que a PCR foi capaz de detectar o DNA do parasita em 97.1% dos casos. Essa positividade foi maior do que aquela encontrada nos outros métodos diagnósticos testados como a coloração com H&E e a imunohistoquímica.

Esses trabalhos, conjuntamente, mostram que a PCR é o melhor método diagnóstico da LT quando comparado com a confirmação parasitológica por meio de: microscopia direta, sorologia e isolamento de parasitas em cultura. Além disso, a PCR ainda é capaz de identificar a espécie de parasita presente na lesão, elevando a contribuição do diagnóstico. No entanto, os elevados custos associados à realização desta técnica e a

necessidade de equipamento apropriado ainda impedem que a PCR seja implantada nas áreas endêmicas. No entanto, a simplificação nos métodos de coleta e processamento de amostras, assim como a alta especificidade e positividade, indicam que a PCR será o método de escolha para o diagnóstico da LT e da leishmaniose muco-cutânea.

### **A Importância do Diagnóstico Precoce da Lesão Mucosa**

A leishmaniose muco-cutânea (LM), também denominada espúndia, é condição de difícil tratamento e prognóstico sombrio quanto à possibilidade de cura clínica<sup>(22)</sup>. Na maioria dos casos, afeta a região nasal anterior, principalmente o septo e o corneto inferior, causando deformidades importantes, como perfuração do septo e destruição da ponta nasal. Pode comprometer também a faringe e a laringe, apresentando risco de obstrução das vias aéreas e morte<sup>(7)</sup>. Acomete cerca de 4% dos pacientes que apresentaram doença cutânea, sendo geralmente diagnosticada de meses a anos após a cura da leishmaniose cutânea (LC)<sup>(42)</sup>.

Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são conhecidos. Llanos-Cuentas *et al.*<sup>(20)</sup> mostraram que o tratamento inicial inadequado pode estar associado com o desenvolvimento da LM.

A patogênese da LM é pouco compreendida. A virulência da *L. braziliensis*, principal espécie relacionada a essa forma clínica, é importante para o desenvolvimento da lesão mucosa. Entretanto, poucos parasitas são encontrados no tecido. Os pacientes apresentam exacerbação da resposta imune celular anti-leishmania com intensa produção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). A escassez de parasitas na lesão e a hiper-responsividade a antígenos de leishmania sugerem um papel importante da resposta imune na patogênese dessa forma clínica<sup>(1,9)</sup>.

A LM costuma apresentar sintomas inespecíficos, de forma que, usualmente, o diagnóstico é tardio quando o paciente já apresenta lesões destrutivas<sup>(22)</sup>.

O diagnóstico clínico dos estágios iniciais da doença mucosa geralmente ocorre como um achado casual durante o exame físico rotineiro de pacientes com lesões cutâneas cicatrizadas. É difícil determinar em que momento a lesão mucosa se inicia. Entretanto, em alguns casos, o acometimento mucoso pode surgir precocemente, com a lesão cutânea primária ainda em atividade. Esses pacientes são assintomáticos ou apresentam sintomatologia inespecífica para o sítio mucoso e desenvolvem lesões iniciais que são detectadas apenas se for realizado exame rotineiro.

Para avaliar a eficácia do exame clínico minucioso na identificação precoce de casos de LM, realizamos um estudo recente no município de Jequié/BA (V. Boaventura, dados não publicados). Foi realizada avaliação otorrinolaringológica rotineira em 220 pacientes com diagnóstico de LC, sendo identificados alguns casos de lesão mucosa concomitante à LC primária (sem história prévia de leishmaniose). Na maioria desses pacientes, as lesões estavam restritas à mucosa nasal e em estágio inicial, sem destruição da cartilagem nasal anterior. Outros autores descreveram lesões mucosas iniciais. Villela *et al.*<sup>(41)</sup> relataram três casos apresentando pontos esbranquiçados no septo nasal e corneto inferior. O tratamento adequado nesse estágio da doença pode evitar o desenvolvimento de lesões destrutivas.

A identificação de lesão mucosa em pacientes com doença cutânea primária demonstra a importância do exame otorrinolaringológico rotineiro dos indivíduos com LC. Esses achados sugerem ainda que muitos casos de LM tardia já podem apresentar alterações mucosas no momento do diagnóstico das lesões cutâneas primárias.

Tradicionalmente, as características clínicas em conjunto com o estudo histopatológico típico, o exame do esfregaço e testes sorológicos positivos representam a melhor evidência para o diagnóstico da LT. Além disso, tanto o diagnóstico clínico quanto o histopatológico podem, individualmente, apresentar 100% de sensibilidade, mas dependem da coleta adequada de uma amostra tissular apropriada e a análise deve ser efetuada por uma equipe experiente de profissionais de saúde. A análise histopatológica de amostras de tecidos das

lesões é particularmente relevante em termos de especificidade, sendo capaz de descartar importantes diagnósticos diferenciais, como lesões neoplásicas malignas e outras doenças infecciosas de significância epidemiológica.

A literatura recente tem confirmado que a detecção do DNA da leishmania em uma variedade de amostras cutâneas por PCR apresenta não somente uma sensibilidade e especificidade de 100%, mas também possibilita o diagnóstico da espécie ou até subespécie responsável pela doença. Essa vantagem da PCR em relação aos demais métodos proporciona uma estimativa do prognóstico e da resposta terapêutica, auxiliando as decisões sobre a condução dos casos pelos profissionais de assistência à saúde. Métodos simplificados para a aquisição de amostras e transporte e técnicas aprimoradas de purificação e análise de DNA têm sido aplicados com sucesso para a realização do diagnóstico individual e epidemiológico da LT. O uso combinado da PCR com os métodos tradicionais representa a melhor alternativa para o diagnóstico espécie-específico. Iniciativas para melhorar a disponibilidade desses métodos nas áreas endêmicas de países em desenvolvimento são emergencialmente necessárias. Este arsenal de técnicas deve objetivar sempre o diagnóstico e a intervenção terapêutica precoces que, quando somados a políticas públicas de saneamento competentes, podem reduzir consideravelmente os danos causados por esta doença infecciosa.

## Referências Bibliográficas

1. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, and Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-6740, 2002.
2. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, and Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 102-109, 1998.
3. Bittencourt A, Barral A, de Jesus AR, de Almeida RP, and Grimaldi Junior G. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 585-586, 1989.
4. Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, and Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 53: 273-277, 1995.
5. Castilho TM, Shaw JJ, and Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol* 41: 540-546, 2003.
6. Chiari AC, Mayrink W, and Magalhães PA. Reação de imunofluorescência no controle do tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 15: 298-303, 1973.
7. Costa JM, Netto EM, and Marsden PD. Acute airway obstruction due to oedema of the larynx following antimony therapy in mucosal leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 19: 109, 1986.
8. Costa JML. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde, 2000.
9. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonca SC, and Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 225-229, 1996.
10. de Bruijn MH and Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 52: 45-58, 1992.
11. de Oliveira CI, Bafica A, Oliveira F, Favali CB, Correa T, Freitas LA, Nascimento E, Costa JM, and Barral A. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 37: e149-153, 2003.
12. Degraive W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, and Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469, 1994.
13. Furtado T. Critérios para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 65: 51-86, 1980.
14. Gontijo B and de Carvalho M de L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 71-80, 2003.
15. Grimaldi G, Jr., David JR, and McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 36: 270-287, 1987.
16. Grimaldi G, Jr., Jaffe CL, McMahon-Pratt D, and Falqueto A. A simple procedure for the isolation of leishmanial parasites and for the recovery of parasite virulence in avirulent stocks. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 560, 1984.

17. Hailu A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42: 251-256, 2002.
18. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Critical Review of Microbiology* 21: 123-152, 1995.
19. Llanos Cuentas EA, Cuba CC, Barreto AC, and Marsden PD. Clinical characteristics of human *Leishmania braziliensis braziliensis* infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78: 845-846, 1984.
20. Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, and Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet* 2: 295, 1984.
21. Manson-Barh PE. Diagnosis. In: *The Leishmaniasis*, edited by R. PWK-K. Londres, 1987, p. 703-728.
22. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80: 859-876, 1986.
23. Marzochi MC. As Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *Jornal Brasileiro de Medicina* 63: 82-104, 1992.
24. Marzochi MC and Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10 Suppl 2: 359-375, 1994.
25. Medeiros AC, Rodrigues SS, and Roselino AM. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 35: 421-424, 2002.
26. Mendonca SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, and Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83: 347-355, 1988.
27. Montenegro J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology* 13: 187, 1926.
28. Oliveira JG, Novais FO, de Oliveira CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha AV, Boaventura V, Noronha A, Costa JM, and Barral A. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 94: 55-59, 2005.
29. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W, and Romanha AJ. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop* 72: 251-258, 1999.
30. Pirmez C, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Goncalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W, and Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 37: 1819-1823, 1999.
31. Pratlong F, Rioux JA, Marty P, Faraut-Gambarelli F, Dereure J, Lanotte G, and Dedet JP. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J Clin Microbiol* 42: 4077-4082, 2004.
32. Reed SG, Badaro R, Masur H, Carvalho EM, Lorencio R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD, Jr., and Jones TC. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35: 79-85, 1986.
33. Rodgers MR, Popper SJ, and Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71: 267-275, 1990.
34. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonca MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militao de Albuquerque Mde F, Jardim ML, and Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 40: 3572-3576, 2002.
35. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, and Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456-465, 2001.
36. Ryan JR, Smithyman AM, Rajasekariah GH, Hochberg L, Stiteler JM, and Martin SK. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 40: 1037-1043, 2002.
37. Shaw JJ and Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 69: 323-335, 1975.
38. Silveira TG, Teodoro U, Arraes SM, et al. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Parana State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 475-476, 1990.
39. Vabres P, Marty P, Kauffmann-Lacroix C, and Larregue M. [Imported cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* confirmed with immunoassay]. *Ann Dermatol Venereol* 128: 1047-1050, 2001.
40. Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 16: 97-101, 2003.
41. Vilela F, Pestana BR, and Pessoa SB. Presença de *Leishmania braziliensis* na mucosa nasal sem lesão aparente em casos recentes de leishmaniose cutânea. *Hospital* 16: 953-960, 1936.
42. Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR, de Magalhaes AV, and Marsden PD. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope* 99: 925-939, 1989.