

Diagnóstico laboratorial dos parasitas do sistema tegumentar

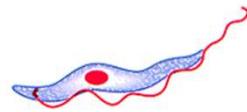
Profa. Dra. Irene Soares

FCF/USP

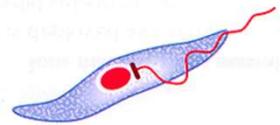
2020

- Leishmanioses
- Oncocercose
- Larva migrans cutânea

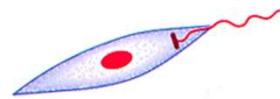
Morfologia dos flagelados da ordem Kinetoplastida



tripomastigota

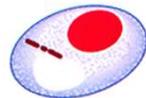


epimastigota



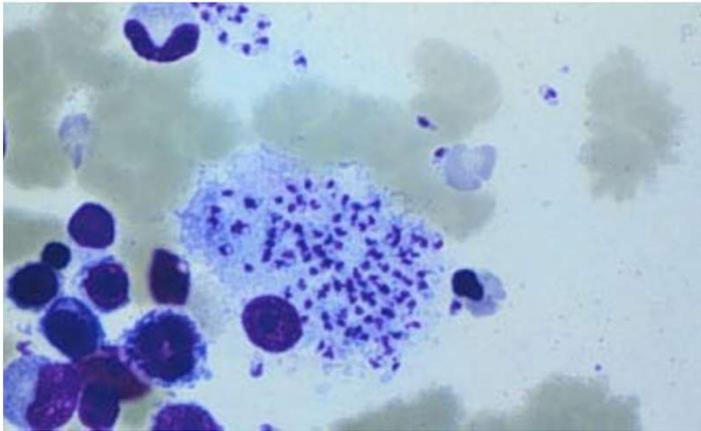
promastigota

Leishmania



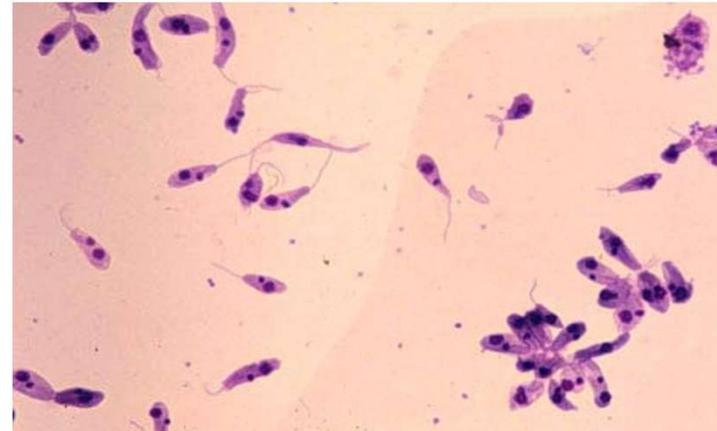
amastigota

Estágios evolutivos do parasita



Amastigota
(hospedeiro vertebrado)

- Intracelular, arredondada, cinetoplasto em forma de bastão e ausência de flagelo livre
- Parasitas exclusivos de células do sistema fagocítico mononuclear
- Multiplicam-se por divisão binária



Promastigota
(no inseto vetor)

- Extracelular, alongada e presença de flagelo

Ciclo Biológico

Vetor

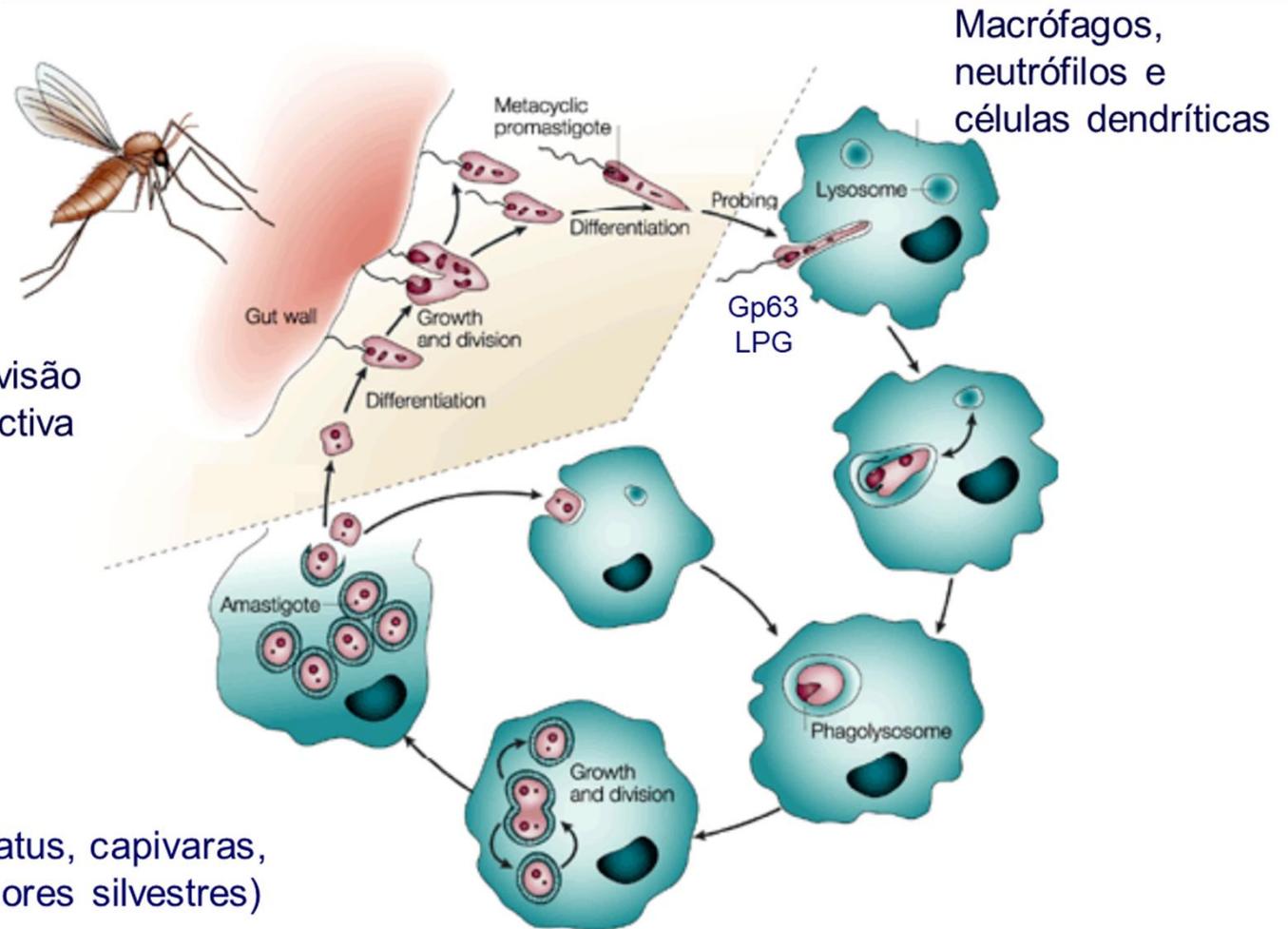
Hospedeiro vertebrado

Phlebotomus sp
Lutzomyia sp

Promastigota

Procíclico: forma de divisão

Metacíclico: forma infectiva



Reservatórios:

- ▶ Animais silvestres (pacas, tatus, capivaras, bichos preguiça e outros roedores silvestres)
- ▶ Animal doméstico (cão)

Sacks & Nancy Noben-Trauth (Nat. Rev. Immunol., 2002)

Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar

Espécies mais importantes no Brasil

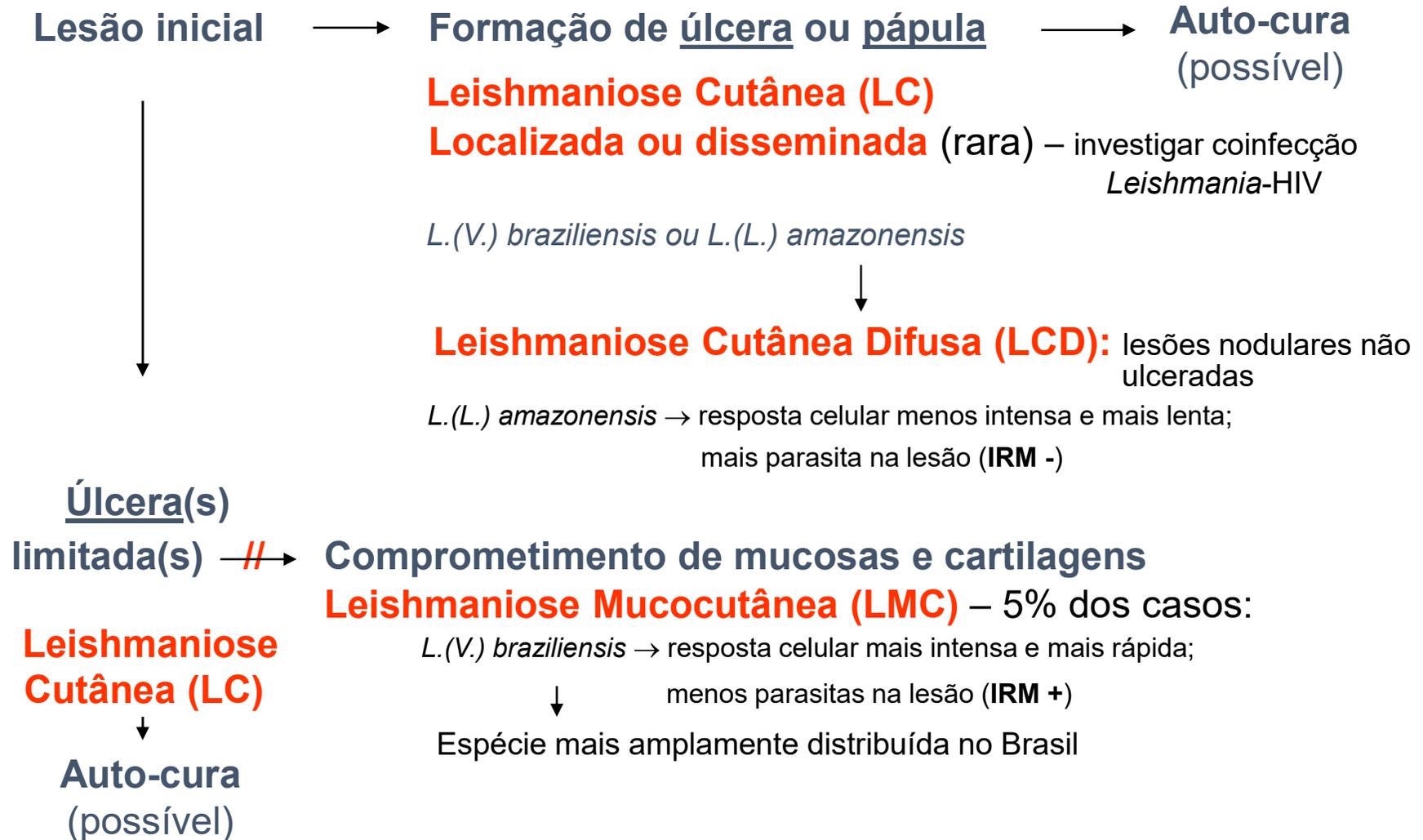
- *L. (Viannia) braziliensis*
 - *L. (Leishmania) amazonensis*
 - *L. (Viannia) guyanensis*
- } Leishmaniose cutânea
- *L. (V.) braziliensis* → Leishmaniose mucocutânea
 - *L. (L.) amazonensis* → Leishmaniose cutânea difusa

Espécies que causam leishmaniose cutânea no Velho Mundo:

- *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*

Vetores: insetos da subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*
(palha, tatuquira, birigui)

Leishmanioses Cutâneas



Quadro clínico

Leishmaniose Cutânea



Lesão ulcerada

Leishmaniose Cutânea difusa



Lesão não ulcerada



Leishmaniose mucocutânea (Úlcera de Bauru)

As principais queixas são: • Obstrução nasal •
Eliminação de crostas (cascas) • Sangramento
no nariz • Dificuldade de engolir • Dor ao engolir
• Rouquidão • Dificuldade para respirar • Tosse

Diagnóstico laboratorial - LC

➤ Diagnóstico Parasitológico:

Pesquisa de amastigotas em esfregaço da lesão ou *imprint* de fragmentos de tecido corados (Giemsa ou Leishman):

Mais apropriado nos casos de leishmaniose cutânea causada pela *L. (L.) amazonensis* ➤ Amastigotas ↑



Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.36 no.1 Uberaba Jan./Feb. 2003 <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>

➤ A probabilidade de encontro do parasita é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após 1 ano

Diagnóstico laboratorial - LC

➤ Diagnóstico Parasitológico:

- Exame histopatológico (HE) ☞ amastigotas
- Cultura: Meios NNN ou LIT (27°C) – método padrão
Os parasitos crescem em cultura entre 4 dias a 6 semanas; em geral, a maioria das culturas mostra-se positiva em 7 a 10 dias



☞ promastigotas

L. amazonensis: cresce bem em meios de cultura

L. braziliensis e *L. guyanensis*: crescem lentamente em meios de cultura

Métodos bioquímicos e imunológicos → identificação de espécie

- Inoculação em animais (tecidos infectados) (hamsters) → observar aparecimento de lesões (~ 1 mês)

L. (Leishmania) amazonensis: altamente virulenta

L. (Viannia) braziliensis e *L. (Viannia) guyanensis*: pouco virulentas para animais de laboratório

Diagnóstico laboratorial - LC

➤ **Diagnóstico Imunológico:**

- **Imunofluorescência indireta:** sensibilidade ↓
- **ELISA:** sensibilidade ↓
- **Intradermorreação de Montenegro (IRM)**

Princípio: teste de hipersensibilidade tardia

Técnica: inoculação de um extrato antigênico de promastigotas na face anterior do antebraço

- 1) fazer assepsia do local da aplicação
- 2) injetar 0,1 mL de antígeno por via i.d.
- 3) após 48 horas, medir o grau de resposta cutânea; a endureção é delimitada com caneta



- ☞ A IRM apresenta-se negativa nos casos de leishmaniose cutâneo-difusa e em pacientes com AIDS

Interpretação:

- ✓ **Reação Negativa:** ausência de qualquer sinal no local de inoculação ou presença de uma pápula com diâmetro **< 5 mm**
- ✓ **Reação Positiva:** presença de pápula ou nódulo com diâmetro **> ou = 5 mm**



Teste reativo após 48h: > 35 mm



Teste reativo após 72h: > 40 mm

Leishmaniose Visceral ou Calazar

Diagnóstico laboratorial - LV

➤ Diagnóstico Parasitológico:

- Exame direto de preparações coradas (Giemsa ou Leishman):
 - ↳ Pesquisa de formas amastigotas
- Amostras: punção aspirativa de medula óssea, linfonodos, fígado e baço
- Cultura: ↳ Pesquisa de formas promastigotas
- Métodos bioquímicos, imunológicos ou moleculares → identif. de espécie
- Inoculação de animais (hamsters)

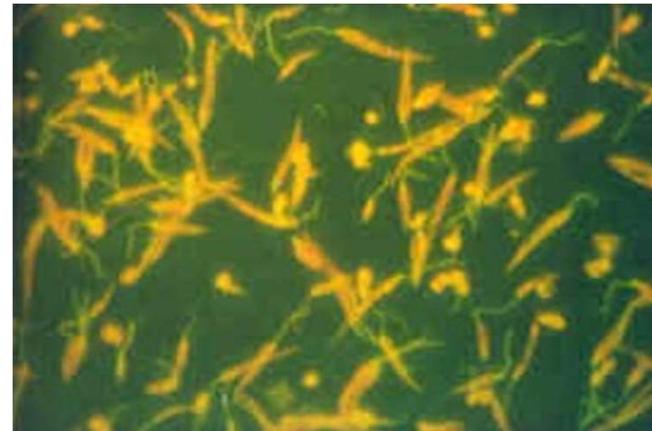
Diagnóstico laboratorial - LV

Diagnóstico Imunológico:

- Intradermorreação de Montenegro (IRM)
 - ☞ A IRM apresenta-se negativa nos casos avançados de leishmaniose visceral

- Imunofluorescência
Títulos de Acs = ou > 80

Limitações: reações cruzadas com leishmaniose tegumentar, Doença de Chagas, malária, esquistossomose



- ELISA: + utilizado

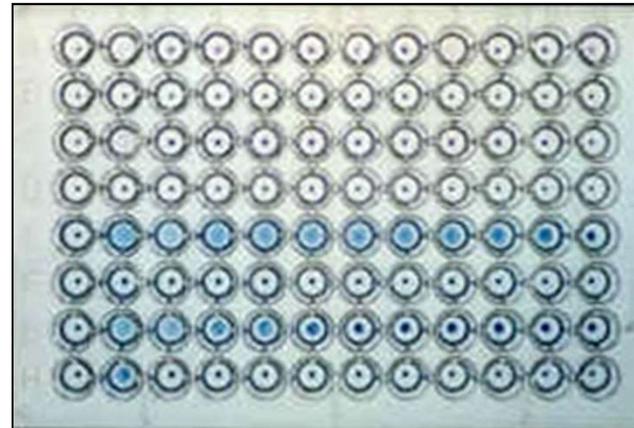
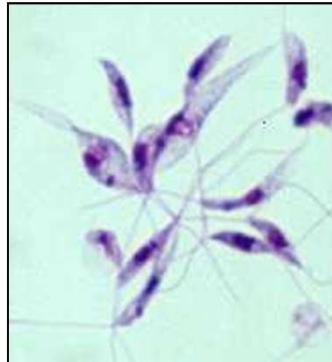
Antígeno bruto ou recombinante (rK39)

Diagnóstico laboratorial - LV

➤ Diagnóstico Imunológico:

- Reação de aglutinação direta (DAT) - quantitativo

Aglutinação de promastigotas corados com Azul de Evans

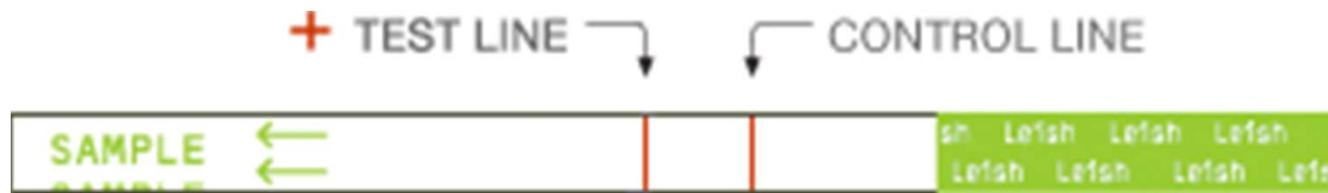


- ✓ Alta sensibilidade e especificidade
- ✓ Utiliza antígenos flagelados de cultura (promastigotas)/ soro paciente
- ✓ Limitações: tempo de incubação longo (18 h)
necessidade de diluições seriadas do soro

Diagnóstico laboratorial - LV

➤ Diagnóstico Imunológico: soro

- Teste imunocromatográfico (presença de anticorpos anti - rK39 ou rK39/K26): 10 min



rK39 ou rK39/K26: antígenos recombinantes

Diagnóstico laboratorial - LV

➤ Exames complementares revelam:

- Anemia
- Leucopenia e/ou plaquetopenia
- Hipergamaglobulinemia

➤ Métodos para caracterização das espécies de *Leishmania*

- **Utilização de anticorpos monoclonais**
Anticorpos monoclonais anti-*Leishmania chagasi*: ELISA/ IFI
- **Perfil de isoenzimas**
- **PCR**: amplificação de genes do RNA ribossomal, de genes de miniexon, de DNA do cinetoplasto e de seqüências de DNA repetitivo

**Outras infecções
parasitárias do
sistema tegumentar**

Oncocercose

Etiologia: *Oncocerca volvulus*



Transmitida pela penetração das larvas infectantes (L3) na pele durante a picada de insetos do gênero *Simulium sp* (“borrachudos” ou “piuns”)

Vermes adultos

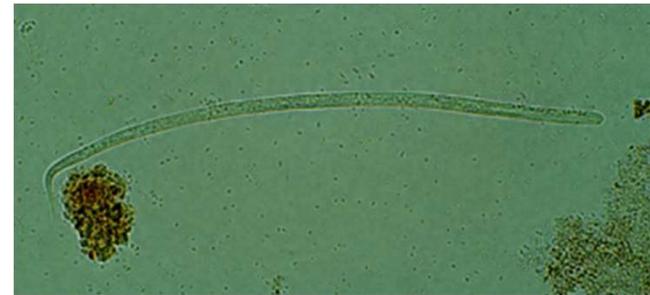
(nódulos subcutâneos)

- Fêmeas: 30-80 cm
- Macho: 3-5 cm

Microfilárias

(pele e tec. linfático)

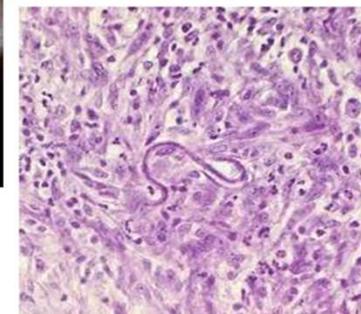
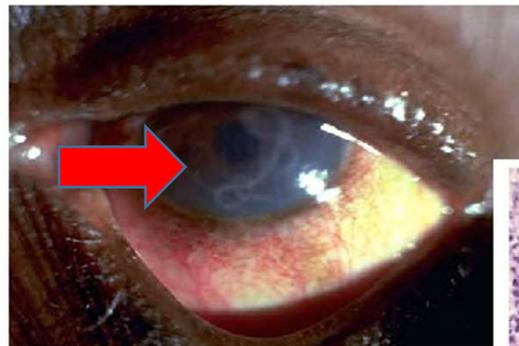
- Tamanho: 220-360 μm
- Sem bainha
- Cauda sem núcleos



Microfilária de *O. volvulus* retirada da pele de um paciente (preparação a fresco)

Manifestações clínicas

- ✓ **Pele** → prurido (coceira), exantemas cutâneos, perda de elasticidade, pápulas, áreas de despigmentação
- ✓ **Tecido subcutâneo** → nódulos (cabeça e ombro)
- ✓ **Olhos** → ceratite, coriorretinite, atrofia do nervo óptico, cegueira (“cegueira dos rios”)



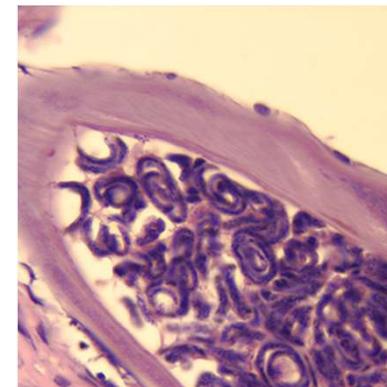
Epidemiologia

- ✓ Nas Américas, apenas cerca de 30% dos indivíduos desenvolvem lesões oculares;
- ✓ A área endêmica no Brasil está restrita às terras indígenas Yanomami, no norte do Brasil, nos estados do Amazonas e Roraima e na fronteira com a Venezuela. O sintoma mais comum é a coceira intensa;
- ✓ Não há registros de casos sintomáticos no Brasil entre o período de 2000 a 2018; apenas uma proporção de portadores assintomáticos de microfilárias na pele



Diagnóstico Laboratorial

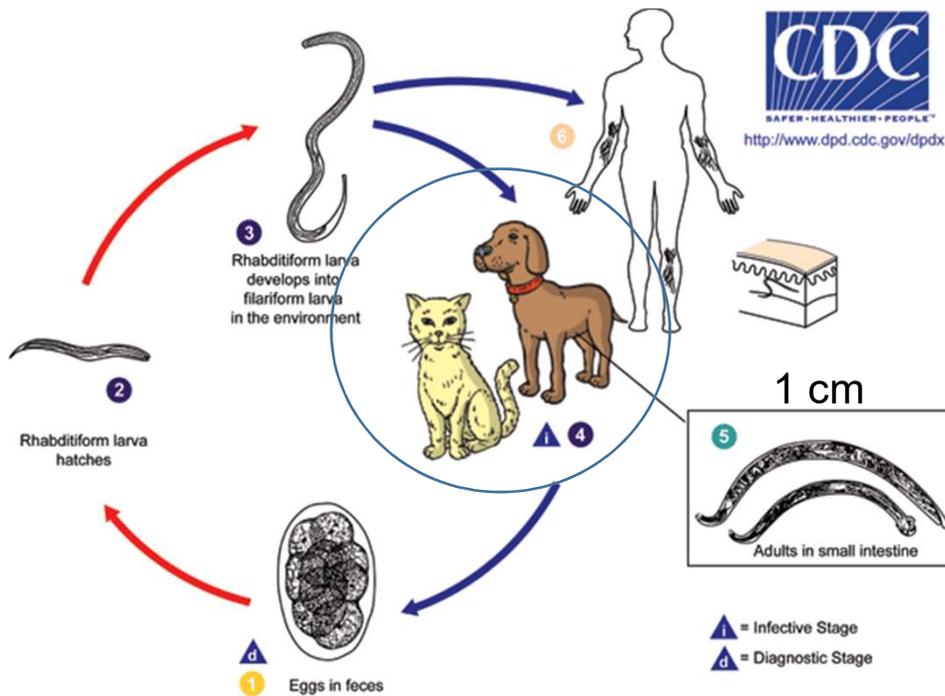
- Identificação de microfilárias em amostras de pele colhidas por biópsia (retalhos cutâneos);
- Identificação de vermes adultos retirados cirurgicamente dos nódulos:
(Panturrilhas, nádegas, tronco e pescoço)
- Os nódulos de parasitas adultos são palpáveis e podem ser identificados por exames de imagem (Tomografia computadorizada ou ecografia)
- Detecção do DNA do parasita por PCR
- Exames oftalmoscópicos do humor aquoso (microfilárias)



Cross-section of an adult female *O. volvulus*, stained with H&E. Note the presence of many microfilariae within the uterus.

Larva migrans cutânea

Ancylostoma braziliense
Ancylostoma caninum



A. caninum

A. braziliense



3 pares de dentes



1 par de dentes



Macho: bolsa copuladora

Também conhecidos como
“bicho geográfico” ou “bicho da areia”

Larva migrans cutânea

- Larvas penetram pela pele e não conseguem completar sua evolução (permanecem entre a epiderme e derme);
- Pontos eritematosos ou pápulas, acompanhadas de prurido no local de penetração das larvas;
- Formação de túneis (trajetos inflamatórios) que avançam 2 a 5 cm por dia;
- Infecções microbianas secundárias podem ocorrer;
- O processo pode curar-se espontaneamente ou durar semanas e meses;
- Diagnóstico é clínico: dermatites

