

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública

Ana Isabele Freitas de Araújo

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE COLETA ATRAVÉS DO SWAB PARA O
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA EM PACIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DE PERNAMBUCO,
BRASIL

RECIFE

2013

Ana Isabele Freitas de Araújo

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE COLETA ATRAVÉS DO SWAB PARA O
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
EM PACIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DE PERNAMBUCO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública
do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho, DSc.

Co-Orientador: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, DSc.

RECIFE

2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- A663a Araújo, Ana Isabele Freitas de.
Avaliação do método de coleta através do swab para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de áreas endêmicas de Pernambuco, Brasil / Ana Isabele Freitas de Araújo. - Recife: s.n, 2013.
88 p. : ilus, tab.
- Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho; co-orientador: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.
1. Leishmaniose cutânea - epidemiologia. 2. Leishmaniose cutânea - diagnóstico. 3. DNA de citoplasto. 4. Reação em cadeia da polimerase. I. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Rodrigues, Eduardo Henrique Gomes. III. Título.

CDU 616.993.161

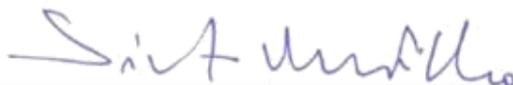
ANA ISABELE FREITAS DE ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE COLETA ATRAVÉS DO SWAB PARA O
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA EM PACIENTES DE ÁREAS ENDÊMICAS DE PERNAMBUCO,
BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Saúde Pública
do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 08 / 03 / 2013

BANCA EXAMINADORA



Dr. Sinval Pinto Brandão Filho (Orientador)

Departamento de Imunologia do CPqAM/ FIOCRUZ

Dra. Zulma Maria de Medeiros (Titular interno)

Departamento de Parasitologia do CPqAM/ FIOCRUZ

Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura (Titular externo)

Departamento de Imunologia da Universidade de Pernambuco

Agradecimentos

A Deus, dono soberano da minha existência, por guiar minha vida, concedendo-me saúde e perseverança nesta grande jornada.

Aos meus pais, Risonete e Abmael Araújo, maior exemplo de vida, pelo incentivo, amor e cuidado demonstrados em todos os momentos da minha vida. É por vocês tudo isto.

A minha irmã Francelle Freitas, pelo fiel companheirismo e paciência infinita.

Ao meu amor André Oliveira pelo carinho, incentivo e cumplicidade presentes ao longo destes anos. Que Deus esteja sempre presente em nossa união.

Ao meu orientador, Dr. Sinval Brandão Filho, que me acompanha há anos, por todo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Seus ensinamentos foram muito importantes para minha formação.

Ao meu co-orientador, Dr. Eduardo Rodrigues, pela confiança, amizade e cumplicidade originadas no desenvolvimento deste trabalho. Suas palavras de incentivo foram valiosas em todos os momentos.

À Dra. Maria Edileuza Brito por todo o carinho, amizade e ensinamentos ao longo destes anos.

Aos indivíduos portadores de leishmaniose cutânea pela voluntária participação neste trabalho.

Ao Núcleo de Vigilância em Saúde e Ambiente do Município de Moreno, em especial a Cláudio Silva, pela ajuda com os pacientes.

Ao Setor de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz/ Universidade de Pernambuco, especialmente a Dra. Ângela Medeiros, pela ajuda fundamental na obtenção das amostras biológicas dos pacientes.

Às minhas co-orientandas Juliana Viana e Joanna Lucia Almeida, por todos os momentos de aprendizagem. O companheirismo demonstrado por vocês foi muito importante em cada etapa deste trabalho. Obrigada por todos os momentos de descontração que deram mais emoção a tudo isto.

A todos os colegas da Equipe Leishmanioses pela ajuda no dia-a-dia, em especial a Vanessa Fitipaldi, Kyldman Silva, José Marinho Júnior e Ana Waléria Sales pela amizade e pelos momentos de construção e descontração. O carinho e o cuidado de vocês foram muito valiosos para mim.

Aos colegas da Equipe Chagas, pertencentes ao nosso Laboratório de Imunoparasitologia, pela ajuda diária, companhia e bons momentos vividos.

Aos amigos da turma do Mestrado Acadêmico em Saúde Pública (2011-2013), por cada momento compartilhado. O convívio com vocês tornou as cargas mais leves e os dias mais felizes.

Aos amigos Érica Lima, Gerlaine Silva, Ozias Henrique e Thiago Soares pela torcida ao longo dos anos. A confiança de vocês me faz mais forte.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por financiar meu estudo.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães em toda sua extensão pelo apoio e infraestrutura disponível para o desenvolvimento do trabalho.

A Pós-graduação em Saúde Pública, sobretudo os docentes, pela dedicação e preciosos momentos de aprendizagem dedicados ao longo deste curso.

A todos que fizeram parte de alguma forma deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“A teoria sem a prática vira 'verbalismo', assim como a prática sem teoria vira ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora da realidade.”

Paulo Freire

ARAÚJO, Ana Isabele Freitas de. **Avaliação do método de coleta através do swab para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de áreas endêmicas de Pernambuco, Brasil.** 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2013.

RESUMO

Dentre os diversos problemas associados à leishmaniose tegumentar americana (LTA), a dificuldade para a obtenção do diagnóstico exerce destaque pelos vários métodos associados para que se obtenha sua definição. A coleta do material biológico tem papel fundamental neste processo, tendo em vista a severidade das lesões aliada às comuns infecções secundárias observadas. O método de coleta empregado no serviço de saúde baseia-se no raspado da lesão e na obtenção de biópsia do local lesionado, caracterizado por promover riscos aos pacientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do método de coleta de amostra biológica através do *swab* para o diagnóstico molecular da LTA. Entre os meses de março de 2011 a junho de 2012 foram selecionados 88 pacientes, dos quais foram coletadas amostras de biópsia, exsudatos cutâneos através do swab e raspado cutâneo. As amostras de biópsia e exsudatos foram avaliadas através da reação em cadeia da polimerase tendo como alvo o minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*. As amostras de raspado cutâneo foram avaliadas através da pesquisa direta microscópica do parasito. O perfil epidemiológico dos pacientes revelou a predominância da doença em indivíduos do sexo masculino (57,8 %) e as faixas etárias acometidas com predominância foram a jovem e adulto, sendo 40,36 anos a média das idades. A maioria dos pacientes foi procedente do município de Moreno, região metropolitana do Recife (70/ 79,54 %). Foram observadas majoritariamente lesões ulceradas com presença de exsudato (90,9 %) e estas se concentraram nos membros inferiores (71,6 %). Ao comparar o resultado do diagnóstico molecular entre as amostras analisadas, obteve-se a convergência de 86,36 %, sendo este valor estatisticamente significativo (p-value < 0,001). Os resultados obtidos sugerem que o método de coleta de amostra biológica através do swab para o diagnóstico molecular da LTA apresenta excelente eficácia quando comparado com o método de biópsia e pode ser implantado em caráter auxiliar no serviço de saúde haja vista sua simplicidade e facilidade de execução, não oferecendo riscos secundários ao paciente.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea, Diagnóstico, DNA de Cinetoplasto, Reação em cadeia da polimerase.

ARAÚJO, Ana Isabele Freitas de. **Evaluation of the collection method by cotton swab to the molecular diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in patients of endemic areas of Pernambuco State, Brazil.** 2013. Dissertation (Master in Public Health) – Center of Research Aggeu Magalhães, Oswaldo Cruz Foundation, 2013.

ABSTRACT

Among the many problems associated with american cutaneous leishmaniasis (ACL), the difficulty in obtaining the diagnosis has highlighted due to the various methods associated to obtain its definition. The collection of biological material is fundamental to this process in view the severity of injuries coupled with common secondary infections observed. The collection method employed in the health service is based on scraping and biopsy of the injured site, and it is characterized by further risks to patients. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of the collection method of biological sample through swab to the molecular diagnosis of ACL. Between March 2011 to June 2012, 88 patients were selected, which were collected biopsy samples, swab exudates and scraping. The biopsy samples and exudates were assessed by polymerase chain reaction targeting the minicircle of kinetoplast DNA (kDNA) of *Leishmania*. The shaved skin samples were evaluated by direct microscopic parasite research. The epidemiological profile of patients revealed the predominance of the disease in males (57.8%) and the age groups affected were predominantly young adult, being 40.36 years the average age. Most patients were from the municipality of Moreno, metropolitan area of Recife (70 / 79.54%). Were observed mostly ulcerated lesions with exudate (90.9%) and these were concentrated in the lower limbs (71.6%). By comparing the results of molecular diagnostics between the samples, there was obtained the convergence of 86.36%, and this value was statistically significant (p-value <0.001). The results suggest that the method of collection of biological sample through swab for molecular diagnosis of ACL shows excellent efficacy when compared with the biopsy method and can be deployed as an auxiliary method in the health service, due to its simplicity and ease of implementation, not offering secondary risks to the patient.

Key-words: Cutaneous leishmaniasis, Diagnosis, Kinetoplast DNA Minicircles, Polymerase chain reaction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Formas amastigota e promastigota de <i>Leishmania</i>	18
Figura 2: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp	19
Figura 3: Distribuição da leishmaniose cutânea	21
Gráfico 1: Distribuição dos casos de LTA notificados no Brasil por região durante o período de 2007 a 2012	22
Figura 4: <i>Punchs</i> descartáveis para obtenção de fragmento cutâneo	23
Figura 5: Esquema do procedimento de biópsia com auxílio de punch	24
Figura 6: Métodos de coleta de amostras biológicas utilizadas na rotina laboratorial para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar	25
Figura 7: Micrografia eletrônica do kDNA de <i>Leishmania</i> spp. composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos	29
Figura 8: Etapas para o diagnóstico conclusivo da leishmaniose tegumentar	31
Figura 9: Coleta de material biológico dos pacientes selecionados no estudo	37
Figura 10: Coleta de exsudatos cutâneos através de swab bacteriológico	38
Figura 11: Procedimento de escarificação da borda da lesão	39
Figura 12: Obtenção de biópsia da borda da lesão cutânea com auxílio de punch	40
Figura 13: Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> com limite de detecção de 10 fg de DNA padrão	47
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose a 1 % corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de swab amplificado a partir de iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i>	49
Figura 15: Eletroforese em gel de agarose a 1 % corado pelo brometo de etídeo,	

mostrando produtos de PCR de amostras de swab e biópsias amplificados a partir de iniciadores específicos para o subgênero *Viannia* 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(V.)	Subgênero <i>Viannia</i>
(L.)	Subgênero <i>Leishmania</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HCl	Ácido clorídrico
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IDMR	Intradermorreação de Montenegro
KCl	Cloreto de potássio
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto de tripanosomatídeos
<i>L.</i>	Gênero <i>Leishmania</i>
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LRC	Leishmaniose recidiva-cútis
<i>Lu.</i>	Gênero <i>Lutzomyia</i>
LV	Leishmaniose visceral
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase (Polymerase chain reaction)
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RNA	Ácido ribonucleico
SbV	Antimonial pentavalente

spp.	Espécies
TAE	Tris-acetato com ácido etilenodiamino tetra-acético
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UPE	Universidade de Pernambuco
USA	Estados Unidos da América (United States of America)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Aspectos históricos da leishmaniose tegumentar americana	14
1.2 Vetores e Hospedeiros	16
1.3 Ciclo biológico	17
1.4 Manifestações clínicas	19
1.5 Epidemiologia da Leishmaniose tegumentar (LT)	21
1.6 Métodos de coleta em LTA	22
1.7 Diagnóstico laboratorial	26
1.7.1 Diagnóstico parasitológico	26
1.7.2 Diagnóstico imunológico	27
1.7.3 Diagnóstico molecular	28
1.8 Tratamento e estratégias de controle	30
2 JUSTIFICATIVA	34
3 PERGUNTA CONDUTORA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral	36
4.2 Objetivos específicos	36
5 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.1 Desenho experimental	37
5.2 Seleção de pacientes	37
5.3 Coleta de amostras	37
5.3.1 Coleta de <i>Leishmania</i> spp. em swab	37
5.3.2 Escarificação	38
5.3.3 Biópsia	38
5.4 Diagnóstico clínico-epidemiológico	38
5.5 Diagnóstico laboratorial	38
5.5.1 Abordagem parasitológica	38
5.5.2 Abordagem molecular	39
5.5.2.1 <i>Extração e purificação de DNA</i>	39
5.5.2.2 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR)</i>	39
5.5.2.3 <i>Análise dos produtos da PCR</i>	40

5.6 Análise dos dados	40
6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	41
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
7.1 Perfil clínico e epidemiológico	42
7.2 Diagnóstico laboratorial	44
7.2.1 Abordagem parasitológica	44
7.2.2 Abordagem molecular	45
8 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos/ CPqAM	66
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
APÊNDICE B - Tabela 6	68
APÊNDICE C - Artigo publicado	72
APÊNDICE D - Artigo para publicação	76

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos da leishmaniose tegumentar americana

Os primeiros métodos de taxonomia de *Leishmania* eram baseados nas diferenças clínicas observadas por médicos em diferentes regiões geográficas do mundo, sendo então, os microrganismos nomeados de acordo com estas diferenças morfológicas causadas por eles (SHAW, 2011).

O primeiro reconhecimento de que um parasito era o responsável pela leishmaniose cutânea foi realizado por um médico do exército russo, no entanto este parasito não recebeu alguma identificação nominal (BOROVSKY, 1898 apud SHAW, 2011). *Helicosoma tropicum* foi o nome dado em 1903 ao parasito causador da leishmaniose cutânea armênic, e ao que estava associado ao calazar indiano, *Piroplasma donovani* (LAVERAN; MESNIL, 1903 apud SHAW, 2011). Ross (1903) criou o gênero *Leishmania* ao discordar de Laveran e Mesnil, acreditando que o parasito se tratava de um novo esporozoário. No mesmo ano, Leishman (1904) associou o mesmo parasito às diferentes formas das infecções causadas por tripanosomas, e confirmou que este também se tratava de um tripanosoma após a divulgação de outros estudos com a informação de que estes microrganismos desenvolviam flagelo em meio de cultivo.

A história da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil pode ser dividida em três períodos, sendo eles o “período das origens imprecisas”, “pré-microbiológico” e “microbiológico”, respectivamente (RABELLO, 1925 apud COSTA, 1992). O primeiro faz referência a poucos registros que causam dúvidas quanto à origem da doença, se autóctone ou introduzida, pois os documentos arqueológicos disponíveis não registram situações que remetam à LTA tão pouco há relatos de cronistas e pesquisadores que assegurem a existência da doença. Segundo Costa (1992), a primeira evidência consistente quanto à leishmaniose em nosso país se refere a uma descrição no Escrito Pastoral Religioso-Político Geográfico citado no livro “Antigüidade de la Syphilis en el Perú” onde é relatado que, durante uma viagem de um missionário desde Tabatinga até o Peru, foram observadas em humanos lesões ulceradas provenientes de picadas de insetos, descrição que sugere, na opinião de Rabello (1925) apud Costa (1992), não somente a existência da doença mas sua principal forma de transmissão.

O período “pré-microbiológico” inicia-se com Moreira (1895) apud Vale (2005), que, estudando o chamado 'botão da Bahia', o relacionou pela primeira vez ao 'botão endêmico dos países quentes'. A partir de 1909, Lindenberg (1909) apud Costa (1992) dá início ao período

microbiológico quando encontra os chamados corpúsculos de Leishman Wright em lesões de pacientes em São Paulo no momento em que estas ulcerações surgiram como uma epidemia na região de Bauru. Gaspar Vianna teve um papel fundamental na história da LTA quando deu o nome *Leishmania braziliensis* a um parasito observado em esfregaços de lesão de paciente de Minas Gerais (VIANNA, 1914 apud COSTA, 1992), e, continuando seus estudos, obteve êxito na cura de pacientes instituindo o tratamento com tártaro-emético, o que, segundo Costa (1992), elevou seu nome à imortalidade.

Pessoa (1961) apud Vale (2005) propunha a subdivisão da *Leishmania braziliensis* nas variedades *braziliensis*, *guyanensis*, *peruviana*, *mexicana* e *pifanoi*, que estariam relacionadas a várias formas clínicas da doença no Brasil. Desde então, a classificação dos parasitos foi impulsionada com a distinção dos complexos *mexicana* e *braziliensis*, baseada em critérios como as características do comportamento do parasita em meios de cultura, experimentação animal e vetores (LAINSON; SHAW, 1972).

Lainson e Shaw (1987), através da verificação de diferenças nas características biológicas, moleculares e bioquímicas, classificaram os parasitos do gênero *Leishmania* que infectam mamíferos em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*.

Nas Américas, circulam onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras da doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil já foram verificadas sete espécies que causam doença no homem, sendo cinco do subgênero *Viannia* e duas do subgênero *Leishmania*. A posição taxonômica das espécies de *Leishmania* que infectam o homem está resumida no Quadro 1 juntamente com suas características de tropismo.

Leishmania (Viannia) braziliensis é o agente etiológico mais importante associado à LTA, pela sua vasta distribuição, ocorrendo em diversas áreas da América (LAINSON; SHAW, 1998). Da mesma forma é reconhecido no Brasil, pois se trata da única espécie que ocorre em todas as unidades federadas sendo a responsável pela maioria dos casos registrados no país (BRASIL, 2007). Em Pernambuco, há evidências que esta é a única espécie envolvida na transmissão da doença com dez variantes circulantes (BRITO et al., 2009).

Quadro 1 – Posição taxonômica e principais tropismos das espécies de *Leishmania* observadas em humanos.

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i> **	<i>L. (Viannia)</i> **	Novo Grupo Taxonômico***
Velho Mundo	<i>donovani</i>	<i>major</i>			
	<i>infantum</i>	<i>tropica</i>			
		<i>killicki</i>			
		<i>aethiopica</i>			
		<i>infantum</i>			
Américas	<i>infantum</i>	<i>infantum</i>	<i>braziliensis</i>	<i>braziliensis</i>	<i>colombiensis</i>
		<i>amazonensis</i>	<i>guyanensis</i>	<i>panamensis</i>	
		<i>mexicana</i>	<i>panamensis</i>		
		<i>venezuelensis</i>	<i>shawi</i>		
		<i>pifanoi*</i>	<i>naïffi</i>		
		<i>garnhami*</i>	<i>lindenbergi</i>		
			<i>peruviana</i>		
Principal Tropismo	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica	Dermotrópica Viscerotrópica

Fonte: Shaw (2011).

Nota: *Espécies cuja posição está sob discussão. **Parasitas pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* que ocorrem somente nas Américas. ***Descritas recentemente estando presente somente nas Américas e apresentam parasitos que não infectam o homem.

1.2 Vetores e Hospedeiros

A principal forma de transmissão de *Leishmania* spp. para mamíferos é através da picada de fêmeas de pequenos dípteros dos gêneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* e *Chinius* no Velho Mundo e, *Lutzomyia*, *Brumptomyia* e *Warileya*, no Novo Mundo (KILLICK-KENDRICK, 1990; YOUNG; DUNCAN, 1994), conhecidos como flebotomíneos (GONTIJO; MELO, 2004). De acordo com Guimarães (2011), os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, pela grande distribuição geográfica e capacidade de transmitir *Leishmania*, são os que apresentam maior importância médica.

Mais de 400 espécies e subespécies foram descritas nas Américas e destas, aproximadamente 40 estão envolvidas na transmissão de *Leishmania* spp. que causam a doença no homem, podendo, ainda, existir mais espécies de vetores não identificadas (SHAW; LAINSON, 1987). Algumas espécies além de estarem envolvidas na transmissão da leishmaniose, são hospedeiras de outros microrganismos, como vírus, nematoides, bactérias e fungos (SHAW et al., 2003).

Várias espécies de flebotomíneos são incriminadas na transmissão da LTA no Brasil, ressaltando-se como principais transmissoras: *Lutzomyia intermedia*, *Lu. migonei*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. wellcomei*, e *Lu. flaviscutellata* (RANGEL; LAINSON, 2003), havendo, entretanto, o registro de infecção natural de outras espécies, como *Lu. neivai* e *Lu. fischeri* (PITA-PEREIRA et al., 2009; ROCHA et al., 2010). Em Pernambuco, 37 espécies já foram identificadas, e há predominância de *Lu. whitmani* no intra e peridomicílio e *Lu. complexa* em áreas de floresta remanescentes de focos de LTA (ANDRADE; DANTAS-TORRES, 2010; BALBINO et al., 2005; BRITO et al., 2012).

Existem várias discussões sobre os conceitos de hospedeiros e reservatórios (ASHFORD, 1996; CHAVES et al., 2007; HAYDON et al., 2002; SHAW, 1988). O termo hospedeiro é bem generalista e diz respeito a uma espécie que abriga ocasionalmente um parasito oportunista que pode ou não comprometer sua sobrevivência (AVILA-PIRES, 2005).

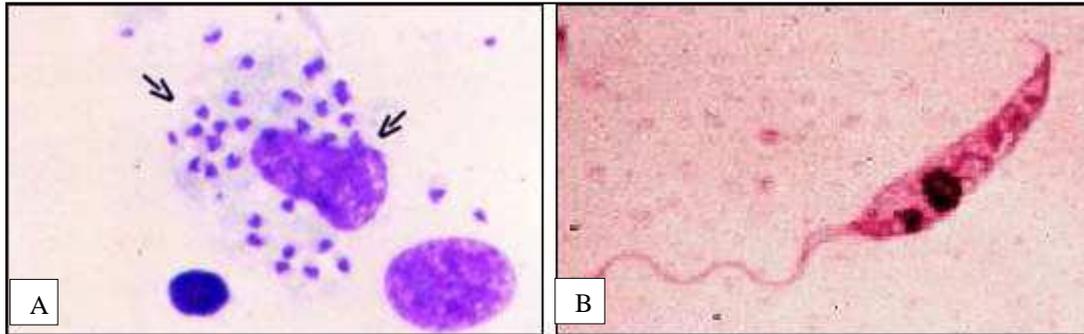
De acordo com Ashford (1996), a relação reservatório-parasito é extremamente complexa, haja vista que diversos fatores ambientais podem interferir nela, tornando-a então imprevisível e dinâmica. Os reservatórios da LTA variam de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na transmissão. Pequenos roedores, marsupiais e edentados são encontrados infectados naturalmente pelo parasito (ARIAS; NAÏFFI, 1981; BRANDÃO-FILHO et al., 1994, 2003; LAINSON; SHAW, 1968, 1973, 1989, 1998; LAINSON et al., 1981; NAÏFFI et al., 1989; SILVEIRA et al., 1991), assim como primatas (LAINSON; SHAW, 1998; SHAW et al., 1991). Ao mesmo tempo, o homem e alguns animais domésticos como cães (MADEIRA et al., 2006; TOLEZANO et al., 2007), equinos (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; YOSHIDA et al., 1990;) e felinos (DANTAS-TORRES et al., 2006; SAVANI et al., 2004) são considerados hospedeiros acidentais.

1.3 Ciclo Biológico

Leishmania spp. apresentam ciclo de vida digenético, e são encontrados sob as formas promastigota e amastigota (Figura 1). A forma promastigota é observada naturalmente apenas no inseto vetor e multiplica-se por divisão binária longitudinal dentro do seu tubo digestivo. Possui estrutura alongada, com um único núcleo e flagelo livre. A amastigota é a forma ovalada de *Leishmania*, com flagelo não exteriorizado e que multiplica-se no interior dos macrófagos, sendo intracelular obrigatória nos hospedeiros vertebrados. Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam, além do único núcleo em seu citoplasma, o cinetoplasto,

característica típica da ordem Kinetoplastida, que se trata de uma mitocôndria incomum constituída de uma rede concatenada de DNA formado por minicírculos e maxicírculos (SIMPSON, 1987).

Figura 1- Formas amastigota e promastigota de *Leishmania*.



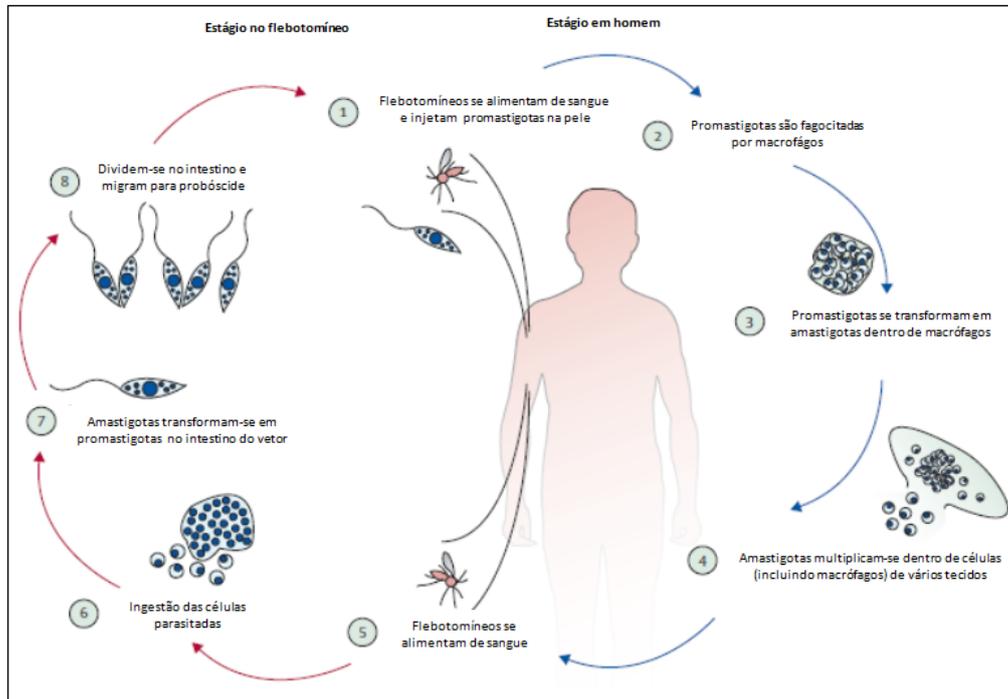
Fonte: Gontijo e Carvalho (2003).

Nota: (A) As setas indicam as formas amastigotas próximas a um macrófago. (B) Forma promastigota.

A infecção nos flebotomíneos ocorre no momento em que a fêmea, ao fazer o repasto sanguíneo essencial para maturação dos ovos, ingere macrófagos parasitados com amastigotas. No intestino do vetor, as células se rompem liberando os parasitos que logo iniciam o processo de transformação para formas flageladas, multiplicando-se e colonizando o local. Ao final de seu processo evolutivo neste hospedeiro, atingem a probóscida do inseto, iniciando a transmissão a um novo hospedeiro vertebrado no próximo repasto sanguíneo (DACCRUZ; PIRMEZ, 2005).

No hospedeiro, as formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos e transformam-se em amastigotas, capazes de multiplicarem-se no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo das células fagocitárias (CHANG; BRAY, 1985). As amastigotas se multiplicam por divisão binária até provocarem o rompimento da célula. Os parasitos livres são então fagocitados por novos macrófagos, e disseminados pelo organismo (ASHFORD, 2000). Dependendo da espécie do parasito envolvido, serão provocadas lesões que caracterizam a leishmaniose tegumentar ou órgãos viscerais serão acometidos, se estabelecendo assim, a leishmaniose visceral (LV), neste último (Figura 2).

A maioria das leishmanioses são zoonoses, com exceção daquelas causadas por *Leishmania (Leishmania) tropica* e *L. (L.) donovani*, ambas ocorrentes no Velho Mundo (BANULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007)

Figura 2- Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de Centers for Diseases Control and Prevention (2012).

1.4 Manifestações clínicas

A LTA apresenta variável grau de comprometimento da saúde humana manifestando-se por diferentes formas clínicas (BARRAL; PEDRAL-SAMPAIO, 1991) que dependem da espécie de *Leishmania* envolvida (LAINSON; SHAW, 1998), da dose infectante, do local do inóculo e da situação nutricional e imunológica do hospedeiro (BEENAL et al, 2003; COURRET et al, 2003; GHOSN; KURBAN, 2008). Sugere-se que espécies e linhagens de *Leishmania* podem ser associadas a diferentes formas clínicas (SCHRIEFER; WILSON; CARVALHO, 2008; VENDRAME et al., 2010) entretanto, esta relação não parece clara, haja vista observar-se localidades onde várias espécies coexistem (GOTO; LINDOSO, 2012).

Após a picada do inseto na pele do hospedeiro surge um pequeno nódulo ou pápula eritematosa, que pode ou não ser acompanhada de linfadenomegalia. As lesões podem ser única ou múltiplas, evoluindo para pápulo-pustulosa, posteriormente úlcero-crostosa e assumindo após isso o aspecto característico de úlcera com contornos circulares, bordas infiltradas, indolor e fundo com granulações grosseiras (COSTA et al., 2009).

Como se trata de uma doença crônica, pode se apresentar inaparente ao longo de anos ou evoluir para o surgimento de lesões cutâneas, localizadas geralmente em áreas mais expostas do corpo, como os membros.

As lesões causadas por *Leishmania* spp. podem assumir quatro formas: localizada, caracterizada pela lesão única; disseminada, caracterizada por inúmeras lesões dispersas por todo o corpo do indivíduo; difusa, com apresentação nodular, e a recidiva cútis, caracterizada pela reativação da lesão. Há ainda a forma mucosa, de natureza metastática na qual pode ocorrer a destruição do septo nasal e boca, resultando em deformidades severas (BRASIL, 2007; REY, 2001), podendo ou não acompanhar os quadros cutâneos ou apresentar-se anos após a lesão inicial.

A forma cutânea localizada (LCL) caracteriza o acometimento da pele após o inóculo do parasito pela picada do inseto transmissor. A lesão é geralmente ulcerada e pode se apresentar de forma única ou múltipla (até 10 lesões). A forma disseminada (LD) é uma expressão considerada rara, sendo observada em até 2 % dos casos (COSTA, 2011), que se caracteriza pela apresentação de múltiplas lesões nodulares, estas que variam de 11 à centenas. Neste caso, o parasito se dissemina pelo corpo do indivíduo infectado por via hemática ou linfática, causando lesões distantes do local da picada. A observação da forma difusa da leishmaniose cutânea (LCD) é ainda mais rara, sendo causada, no Brasil, por *L. (L.) amazonensis*. Esta forma ocorre em pacientes anérgicos, com deficiência na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (CONVIT, KERDEL-VEGAS; GORDON, 1962; GONTIJO; CARVALHO, 2003; SPITHILL; GRUMONT, 1984). A forma recidiva cútis (LRC), ou metaleishmaniose, caracteriza-se pelo surgimento de lesões nodulares, inicialmente isoladas, em seguida confluentes, geralmente em torno da cicatriz de uma lesão anterior. Tem desenvolvimento tardio e de longa duração (COSTA et al., 2009; COSTA, 2011).

É estimado que 3 % a 5 % dos casos de LCL desenvolverão a leishmaniose mucosa (LM) (MARSDEN, 1986), que é caracterizada por ser secundária à LCL, com início discreto e com ausência de sintomas. Esta manifestação produz uma destruição progressiva das cartilagens e ossos na face, faringe e laringe (AMATO et al., 2007; TUON et al., 2008).

Classicamente, as lesões possuem bordas elevadas, fundo granulomatoso, geralmente com exsudação, podendo curar espontaneamente ou evoluir, em geral após alguns meses, para uma doença estabelecida, onde infecções bacterianas secundárias são comuns (GONZALEZ et al., 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; 2012; PISCOPO; MALLIA, 2006).

A relevância da doença também está associada, dentre outras características, na possibilidade de assumir formas graves que podem culminar em lesões destrutivas, desfigurantes e até incapacitantes, situações que podem, inclusive, interferir no campo psicossocial do indivíduo (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

1.5 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar (LT)

A leishmaniose tegumentar apresenta distribuição mundial, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo registrada em todos os continentes, com exceção da Oceania. A organização mundial de saúde (OMS) estima que 12 milhões de pessoas em 98 países ao redor do mundo estão infectadas e que 350 milhões de pessoas estão sob o risco de adquirir a doença (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Noventa por cento dos casos ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (Figura 3) (DESJEUX, 2004). A OMS considera a doença como emergente, recomendando que as pesquisas se concentrem na geração de novos conhecimentos e, sobretudo na aplicação de novas abordagens para seu controle (REMME et al., 2002; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

Figura 3- Distribuição da leishmaniose cutânea.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2007).

Nota: Os países em azul mais escuro são responsáveis por mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea.

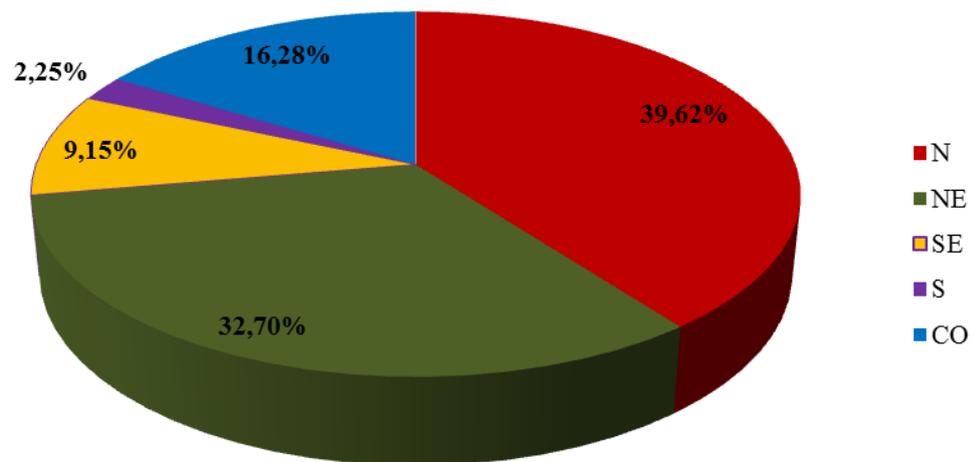
No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição geográfica com registro de casos em todas as regiões do país com diferentes perfis epidemiológicos. Apesar da subnotificação, foram registrados 122.423 casos entre os anos 2007 e 2012¹. A doença ocorre em todas as faixas etárias, com predominância entre os jovens (20 a 39 anos) e do sexo masculino,

¹ Dados preliminares referentes ao ano de 2012: 8.277 casos. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2012).

representando 40,1% e 72,1% respectivamente (SISTEMA NACIONAL DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2012).

Observa-se que as regiões Norte e Nordeste concentram mais de 70 % do total do número de casos do país (Gráfico 1), locais que preservam características propícias à colonização de hospedeiros e insetos vetores.

Gráfico 1- Distribuição dos casos de LTA notificados no Brasil por região, durante o período de 2007 a 2012.



Fonte: Sistema de Informação Nacional de Agravos e Notificação (2012).

Nota: (N) Norte; (NE) Nordeste; (SE) Sudeste; (S) Sul; (CO) Centro Oeste.

Em Pernambuco, a doença incide em todas as regiões, entretanto, de acordo com Brandão-Filho et al. (1999; 2003), a Zona da Mata é responsável por cerca de 60 % dos casos registrados no Estado, onde, somente em 2011, foram notificados 459 ocorrências de LTA (SINAN, 2012). Em contrapartida, tem se observado uma substancial expansão da doença, com o aumento do número de casos nos municípios do Sertão (LEISHMANIOSE..., 2002).

Características eco-epidemiológicas próprias da região, além daquelas resultantes das modificações antrópicas ao longo dos anos, favorecem a manutenção dos hospedeiros e colonização dos insetos vetores, que vem desenvolvendo alto grau de adaptação a diversos ecótopos (GOMES et al., 1989; MARZOCHI, 1992).

1.6 Métodos de coleta em LTA

Como a LTA apresenta sintomatologia exclusivamente dermatológica, a biópsia da lesão constitui o principal recurso para conduzir o diagnóstico. Ela consiste na retirada de um

fragmento do tecido que é encaminhado para exames específicos, como o histopatológico, pesquisa direta em *imprint*, cultivo *in vitro* e diagnóstico molecular.

Existem diferentes técnicas para a obtenção da biópsia. Estes podem ser por curetagem, utilização de *shaving*, *punch*, lâmina de bisturi ou de tesoura cirúrgica. Em casos suspeitos de LTA, utiliza-se o *punch* (Figura 4) para o procedimento, por se tratar geralmente de lesões ulceradas. Classicamente, neste tipo de lesão, obtém-se mais informação a nível histológico se a biópsia for realizada na borda e não no centro da lesão, onde as alterações poderão ser inespecíficas (ALVES et al., 2011).

Figura 4- *Punchs* descartáveis para obtenção de fragmento cutâneo.



Fonte: EBOS Healthcare (2013).

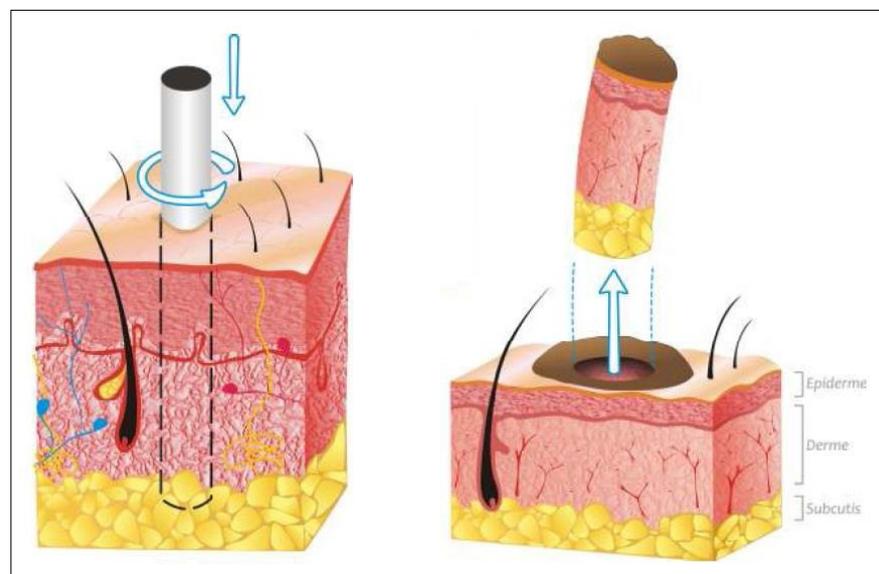
Nota: Observa-se a extremidade circular cortante, em diferentes diâmetros, que demarca o local a ser retirado.

A lesão que necessite ser biopsiada deve ser a mais representativa possível da doença suspeita, que não apresente infecção secundária e que preferencialmente não tenha sido tratada. A biópsia deve ser efetuada em lesões de aparecimento recente e não traumatizadas (ALVES et al., 2011). Assim, existem condições especiais nas quais este procedimento seja evitado ou até mesmo não realizado, como por exemplo, lesões com tempo de evolução extenso, que estejam escoriadas, ulceradas ou com alterações de pigmentação pós-inflamatórias (ALVES et al., 2011), bem como em casos de melanoma. Além disso, em pacientes com deficiência de coagulação, a biópsia também não é recomendada (MANOCHA; BANSAL; FARAH, 2011). Não obstante, em lesões que estejam localizadas em áreas muito sensíveis do corpo, como na face, a biópsia também não é apropriada,

restando dessa forma, outros métodos para obtenção do material, como os descritos mais adiante.

A retirada de biópsia constitui-se na imposição do punch na extremidade da lesão com posterior rotação da ferramenta, ao mesmo tempo em que esta é introduzida até a profundidade desejada pelo médico e retirada em seguida (BRASIL, 2007) (Figura 5). Sendo realizado de forma correta, o procedimento engloba a epiderme, a derme e o tecido celular subcutâneo. Desta forma, é um método extremamente invasivo, que oferece riscos ao paciente, desde a complexidade do procedimento, considerado microcirúrgico, até pelos cuidados necessários após a obtenção do material.

Figura 5- Esquema do procedimento de biópsia com auxílio de punch.



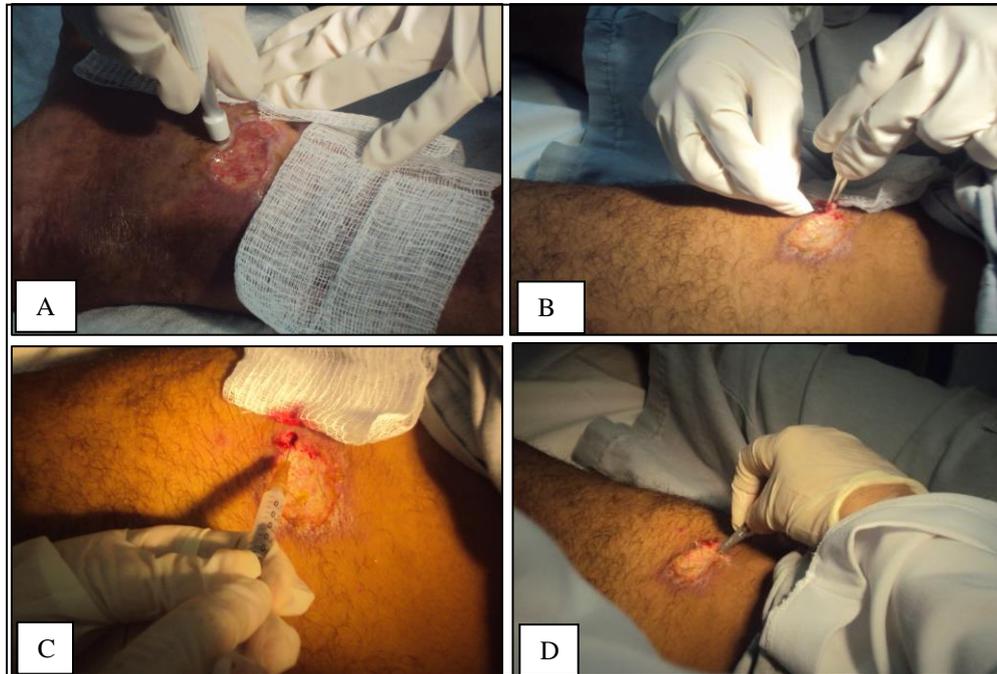
Fonte: Antonio (2012).

Nota: Destaca-se a profundidade do fragmento, que se estende até o tecido subcutâneo.

Outro método de coleta comum na LTA é a punção aspirativa da lesão, que, de acordo com o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL, 2007) é realizada após injeção de 0,3 mL de solução salina estéril na borda da lesão ou linfonodo, utilizando-se de preferência seringa de 5 mL e agulha 25x8. O material aspirado é então inoculado em meio de cultivo ou em animal, neste caso, o hamster.

Há ainda a escarificação, onde se utiliza uma lâmina de bisturi estéril para a raspagem da borda interna da lesão. O material obtido é posto em lâminas de microscopia, fixado, corado e observado posteriormente em microscopia óptica (BRASIL, 2007). Na figura 6 observam-se os métodos descritos.

Figura 6- Métodos de coleta de amostras biológicas utilizadas na rotina laboratorial para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.



Fonte: Araújo (2011a).

Nota: (A) Utilização de 'punch' para biópsia. (B) Retirada do fragmento com auxílio de pinça. (C) Punção aspirativa da borda da lesão. (D) Escarificação com lâmina de bisturi.

Cabe ressaltar o constrangimento no qual os pacientes são submetidos, no que se refere à exposição demasiada para o diagnóstico da doença, além do sofrimento inerente à situação de enfermidade.

Nos últimos anos, tem se discutido sobre técnicas não invasivas para obtenção de material biológico de pacientes portadores de LT visando o diagnóstico (CORVALAN et al., 2011; GARCIA et al., 2007; MIMORI et al., 2002). No entanto, há dificuldades para a validação de alguns destes métodos, que podem decorrer devido à escassez de pacientes nas áreas cujos trabalhos foram realizados. Além disso, pouco foi comentado no que se refere à avaliação da eficácia dos mesmos.

Relata-se o uso do swab bacteriológico para a coleta de material biológico destinado ao diagnóstico de algumas doenças, como tuberculose (SALEM et al., 2007) e coqueluche (ALMEIDA et al., 2011; BRASIL, 2005), na análise citológica cervical (ALVES, 1999), em LT, para a análise de infecções secundárias (EDRISSIAN et al., 1990; GONÇALVES et al., 2009; VERA; SANTOS; MACÊDO, 2001) e mais recentemente, também para o diagnóstico molecular desta última (MIMORI et al., 2002). Verifica-se também o uso desta ferramenta

para o diagnóstico da LV canina (FERREIRA et al., 2008; LEITE et al., 2011), a partir da coleta de material da conjuntiva ocular dos animais e posterior análise molecular por PCR.

1.7 Diagnóstico laboratorial

Devido às diversas manifestações clínicas da LTA, observa-se muita similaridade com outras patologias, como furúnculos, piodermites, paracoccidiodomicose, esporotricose, lúpus vulgaris, sífilis, tuberculose cutânea, entre outras. Neste sentido, o diagnóstico clínico nem sempre é simples e imediato (GONTIJO; CARVALHO, 2003), sendo necessária a associação com dados epidemiológicos e a demonstração do parasito através de exames laboratoriais para chegar à conclusão diagnóstica. A identificação da presença de *Leishmania* spp. é importante para a administração do tratamento de forma rápida, tendo em vista tanto a toxicidade do tratamento quanto à gravidade da manifestação cutânea da doença (NAVIN; ARANA; DE MÉRRIDA, 1990).

É descrito que os casos de LTA causados por *L. (V.) braziliensis* manifestam-se com uma gravidade clínica maior, além de apresentar resistência ao tratamento quimioterápico (ROMERO et al., 2001). Dessa forma, a identificação da espécie de *Leishmania* traz um valor adicional de fator prognóstico, no momento em que é estimada a resposta clínica à terapêutica a ser instituída.

1.7.1 Diagnóstico parasitológico

A visualização do parasito por meio de exame direto representa atualmente o padrão ouro no diagnóstico das leishmanioses. Esta visualização é realizada em microscopia óptica através da pesquisa direta de formas amastigotas em material obtido por escarificação, *imprints*, punção aspirativa e biópsia da borda da lesão sugestiva de LTA (BRASIL, 2007; COSTA, 1992; MEDEIROS; ROSELINO, 1999). A identificação de *Leishmania* spp. por este método é rápida e fácil, entretanto não discrimina espécies e sua sensibilidade, que é de apenas 60 a 65 % (SINGH, 2006), apresenta-se inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão, com exceção dos pacientes que desenvolvem a forma difusa da doença, pois neste caso os nódulos presentes na pele são ricos em parasitos (CUBA CUBA et al., 1981; 1986).

O exame histopatológico, realizado a partir da biópsia da lesão, embora seja empregado para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp., é muito mais útil para

o diagnóstico diferencial, pois é utilizado rotineiramente como técnica diagnóstica para o estudo de processo ulcerativo desconhecido, estabelecendo, assim, outras etiologias (WEIGLE et al., 1987). Além disso, a sensibilidade do exame histopatológico é baixa devido à escassez de parasitos ou distorção de amastigotas ao fixar o tecido (RODRIGUES, 2000).

Neste quadro, há ainda a tentativa do isolamento do parasito *in vivo*, inoculando o material obtido de lesões em animais susceptíveis como o hamster (*Mesocricetus auratus*), ou *in vitro*, no qual é utilizado geralmente o meio NNN (BRASIL, 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003; NICOLLE, 1908; NOVY; McNEAL, 1904). Entretanto, a cultura não é muito sensível, comprometendo o resultado final (DE BRUIJN et al., 1993). Este método apresenta sensibilidade em torno de 50% para *L.(V.) braziliensis* (MONTENEGRO, 1926).

1.7.2 Diagnóstico imunológico

Técnicas imunológicas proporcionam parâmetros indiretos para o diagnóstico da LTA (CASTRO, 2011). No Brasil, os mais utilizados incluem a Intradermorreação de Montenegro (IDRM), Reação de imunofluorescência indireta (RIFI), Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) e Western blot para detecção de anticorpos circulantes específicos contra antígenos parasitários.

A IDRM avalia a presença de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania*. Apesar de não discriminar doença atual de passada e de ser negativo nas formas cutâneo-difusas e nos pacientes imunodeprimidos, possui grande valor presuntivo no diagnóstico da LTA, sendo útil em inquéritos epidemiológicos nas áreas endêmicas (KAR, 1995; MARZOCHI et al., 1980; SHAW; LAINSON, 1975). Em contrapartida, é frequente a observação de reatividade nas populações de áreas endêmicas, de tal forma que esta técnica não é útil no diagnóstico de lesão ativa.

A RIFI e o ELISA são técnicas mais sensíveis, menos invasivas e de execução mais simples quando comparadas com os exames parasitológicos. Entretanto, as metodologias não são espécie-específicas, existindo a possibilidade de reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, dificultando assim o seu uso em áreas endêmicas onde ocorrem a doença de Chagas e leishmaniose visceral (LV) de forma simpátrica (FURTADO, 1994; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A RIFI geralmente não tem sido muito eficiente no diagnóstico de LTA, devido aos baixos níveis de anticorpos circulantes (BRYCESON, 1970). No entanto, os níveis de anticorpos detectáveis são mais elevados nos casos de LTA com múltiplas lesões (MENZEL;

BIENZEL, 1978) e muito baixos nos casos de LTA localizada (SHAW; LAINSON, 1975). Sua sensibilidade é estimada em 71 % e pode alcançar 100 % na LM, na qual a resposta imunológica do hospedeiro é intensa (MENDONÇA et al., 1988).

O ELISA tem uma sensibilidade similar à RIFI, entretanto é mais conveniente para estudos epidemiológicos (HOMMEL et al., 1978). Em 2000, Brito e colaboradores propuseram um teste diagnóstico através de western blot, em que alguns antígenos se destacaram como potencialmente relevantes para o diagnóstico de LTA.

Rocha et al. (2006) descreveram o uso da citometria de fluxo como técnica de diagnóstico sorológico. Foi destacado que o método permite a análise quantitativa dos anticorpos, sendo o procedimento útil no diagnóstico da leishmaniose cutânea ativa, além de ser uma ferramenta sorológica adicional na discriminação entre infecções por outros tripanosomatídeos.

1.7.3 Diagnóstico molecular

Diante da complexidade da LTA, há necessidade do desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais acurados no sentido de identificar espécies de *Leishmania* e que satisfaçam os seguintes critérios: i) identificação rápida e direta dos parasitos nos vetores, reservatórios e amostras teciduais, particularmente biópsias de lesões recentes ou que cicatrizaram espontaneamente; ii) capacidade de distinguir diferentes espécies patogênicas; iii) possibilidade de automação permitindo a análise de um grande número de amostras e iv) facilidade de realização em áreas endêmicas (RODRIGUEZ et al., 1994).

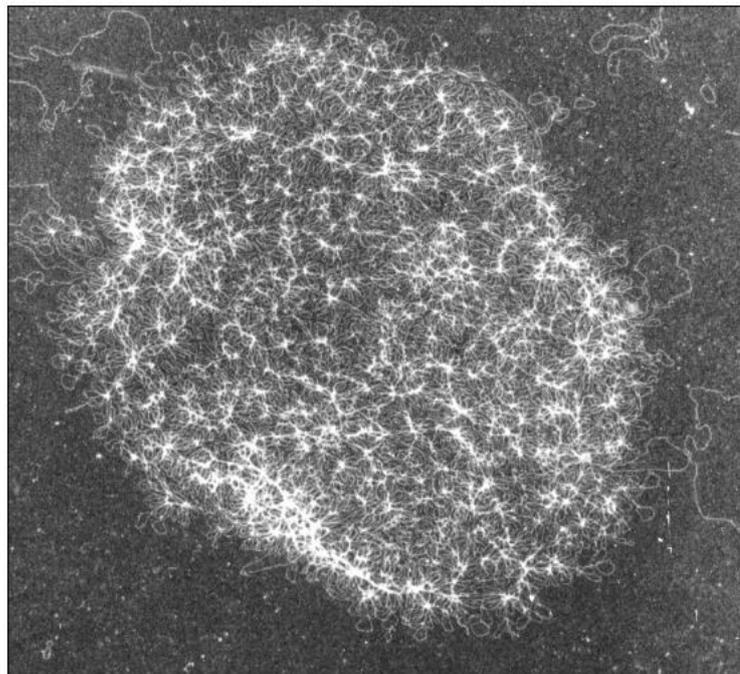
Com o avanço da biotecnologia, o diagnóstico molecular constitui o método mais sensível e específico entre os convencionalmente utilizados no diagnóstico das leishmanioses. Neste contexto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui o principal teste devido à sua alta sensibilidade e especificidade, podendo detectar DNA ou RNA do parasito antes mesmo de surgirem sintomas ou sinais clínicos (SINGH; SIVAKUMAR, 2003).

A disponibilidade de métodos de PCR permitem também maior rapidez no diagnóstico, além da identificação de espécies de *Leishmania* e a utilização a partir de diferentes substratos (BERRAHAL et al., 1996; FISA et al., 2001; LACHAUD et al., 2002).

Vários estudos têm demonstrado a importância do uso do DNA do cinetoplasto (kDNA) como alvo para a identificação e classificação de espécies de *Leishmania* (DASGUPTA et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 1994). O kDNA (Figura 7) consiste em um tipo incomum de DNA mitocondrial que compreende dois componentes: os maxicírculos e os

minicírculos, sendo este último utilizado em diagnóstico molecular por hibridização com sondas moleculares, por PCR (STUART, 1983; BARKER; BUTCHER, 1983; GRAMICCIA et al., 1992; RODRIGUES et al., 2002) e por taxonomia (RODRIGUEZ et al., 2000). Os maxicírculos tem de 20 a 40 kb, estão presentes de 30 a 50 cópias e os minicírculos tem aproximadamente 850 pares de base (pb) e estão presentes em cerca de 10.000 cópias/ célula, representando cerca de 95 % do kDNA (RAY, 1987). Nos minicírculos, existe uma região de aproximadamente 200 pb que é conservada, enquanto que a região restante é considerada variável, sendo heterogênea mesmo entre cepas de uma mesma espécie (FERNANDES et al., 1999). Desta forma, a amplificação por PCR deste alvo presente em múltiplas cópias permite a detecção de infecção por *Leishmania* com maior sensibilidade. Esta técnica, com suas extraordinárias sensibilidade e especificidade, que chegam a 95,4 e 100 %, respectivamente (RODRIGUES et al. 2002) e 100 % de positividade e especificidade (DE OLIVEIRA et al., 2003), oferece novas possibilidades e alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos em leishmaniose (DE BRUIJN; BARKER, 1992; DE BRUIJN et al., 1993; RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; WILSON, 1995). Além disso, os custos vêm diminuindo rapidamente, o que proporciona a sua ampla utilização em laboratórios de centros de pesquisas.

Figura 7- Micrografia eletrônica do kDNA de *Leishmania* spp. composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos.



Fonte: Barker (1989).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido utilizada nos últimos anos, sendo capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento do alvo amplificado em amostras provenientes de humanos, cães e flebotomíneos para diferentes análises como em estudos de infecção natural e interação parasito-hospedeiro (FRANCINO et al., 2006; PENNISI et al., 2005; PITA-PEREIRA et al., 2012; RANASINGHE et al., 2008).

Neste contexto, a utilização do diagnóstico molecular, através de PCR convencional, na LTA é bastante atraente, por ter a capacidade de processamento de várias amostras simultaneamente, com alta sensibilidade, segurança e rapidez.

1.8 Tratamento e estratégias de controle

O tratamento da LTA é implementado somente quando há a definição de caso após uma série de etapas de diagnóstico (Figura 8).

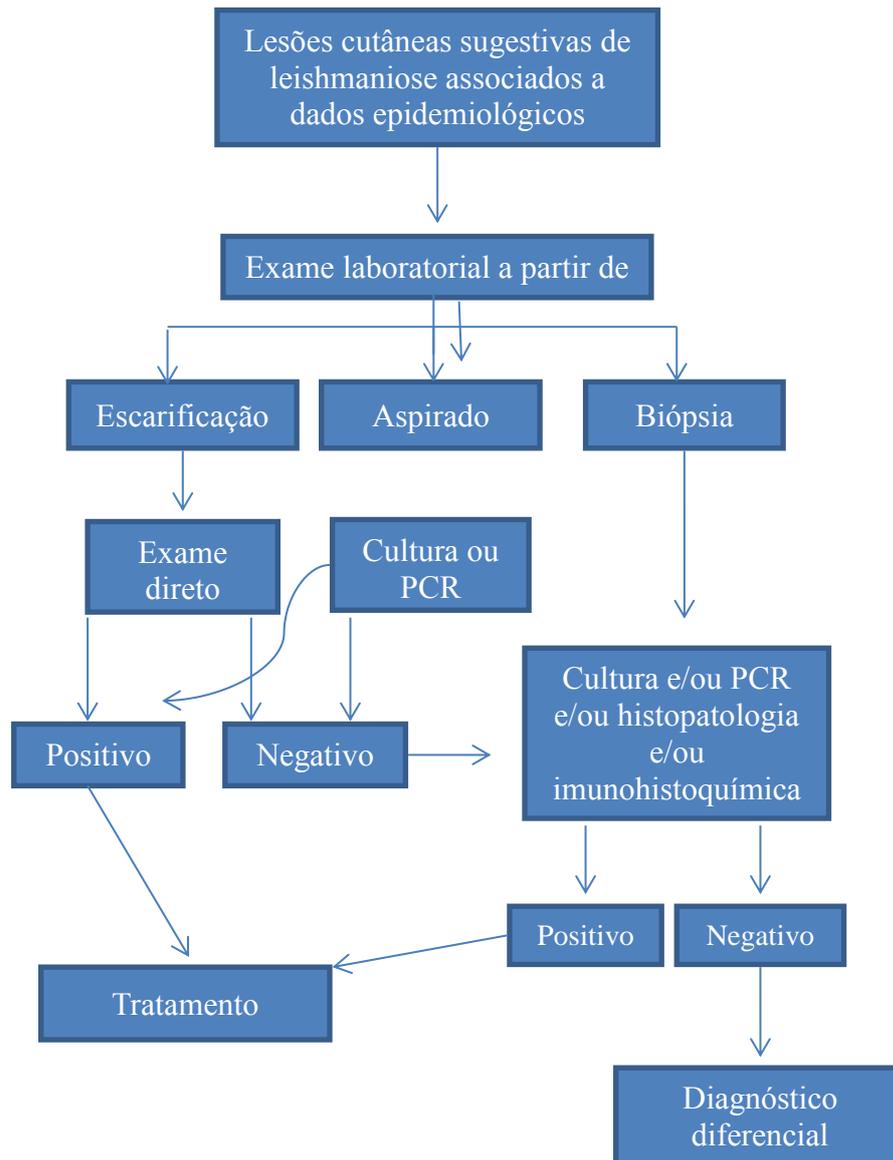
Ele é realizado através de quimioterapia por antimoniais pentavalentes (SbV), o qual proporciona ao paciente a cura clínica, ou seja, a cicatrização das lesões e reepitelização do local. Os antimoniais são as drogas de escolha desde 1945 para o tratamento das leishmanioses (LIMA et al., 2007), os quais são disponibilizados sob as formas de antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime[®]) e estilboglocunato de sódio (Pentostan[®]), porém, em caso de gestantes e pacientes coinfectados com HIV, a anfotericina B é considerada a droga de primeira escolha para o tratamento da LTA (BRASIL, 2011 a). Contraindicações para o uso de antimoniais pentavalentes incluem, além de gravidez, insuficiência renal, cardíaca ou hepática (GOTO; LINDOSO, 2012). Novas formulações da anfotericina B, como a anfotericina B lipossomal, têm sido empregadas com sucesso (SUNDAR et al., 2006). Porém, o alto custo dessas formulações tem sido um fator limitante, inclusive no Brasil, sendo recomendada apenas em casos especiais (BRASIL, 2006).

Há ainda a utilização do miltefosine, o qual demonstrou cura efetiva em estudo com LV na Índia (PRASAD et al., 2004), e altas taxas de cura da LTA no Brasil e na Bolívia (MACHADO et al., 2010; SOTO et al., 2008). Esta droga apresenta a vantagem de ser de uso oral e bem tolerada, embora seja considerada teratogênica, o que limita a sua utilização por grávidas e nutrízes (PRASAD et al., 2004).

A quimioterapia deve ser feita sob vigilância, pois as drogas são altamente tóxicas e muitas vezes causam reações adversas graves, que compreendem artralgia, mialgia, náusea, vômito, sensação de plenitude gástrica, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, dor abdominal, insuficiência renal aguda por alteração da liberação do hormônio antidiurético e alterações

dose-dependentes do eletrocardiograma (LIMA et al., 2007), inclusive com relato de óbito (OLIVEIRA et al., 2005) . Dessa maneira, o uso das drogas em diversos grupos de pacientes, como crianças e idosos é limitado, levando em algumas ocasiões a interrupção do tratamento (BRASIL 2007; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Figura 8 – Etapas para o diagnóstico conclusivo da leishmaniose tegumentar.



Fonte: Goto e Lindoso (2012).

Recentemente, um relatório da reunião da OMS foi publicado e, nele, recomenda-se o tratamento baseado no grau de evidência, distribuição geográfica, manifestação clínica e espécies de *Leishmania* envolvida (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). O Brasil adota política de tratamento (Tabela 1), distribuindo o Glucantime[®] em doses

recomendadas de acordo com as manifestações clínicas apresentadas pelo paciente (BRASIL, 2006; 2007; GONTIJO; MELO, 2004).

Tabela 1- Dose recomendada das drogas de primeira linha para o tratamento da LTA de acordo com a Organização Mundial de Saúde e o Ministério da Saúde do Brasil.

Forma Clínica	Antimonial Pentavalente		Anfotericina B		Pentamidina	
	OMS	Brasil	OMS	Brasil	OMS	Brasil
LCL	20 mg/kg/dia por 20 dias	10-20 mg/kg/dia (15 mg/kg/dia) por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 1-1.5 g	4mg/kg/dia	4mg/kg/dia Dose total máxima: 2 g
LCD	20 mg/kg/dia por 20 dias	10-20 mg/kg/dia por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 1-1.5 g	ND	4mg/kg/dia Dose total máxima: 2 g
LD	20 mg/kg/dia por 20 dias	20 mg/kg/dia por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 1-1.5 g	ND	ND
LM	ND	10-20 mg/kg/dia por 20 dias	ND	1mg/kg/dia Dose total: 2.5-3 g	ND	4mg/kg/dia Dose total máxima: 2 g

Fonte: Goto e Lindoso (2010).

Legenda: LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada/ LCD - Leishmaniose Cutânea Disseminada/ LD - Leishmaniose Difusa/ LM - Leishmaniose Mucosa/ ND - Não determinado.

O sucesso para a cura depende, além do correto tratamento, da resposta imunológica do paciente, da relação espécie de *Leishmania* envolvida *versus* dose infectante, cronicidade das lesões, além de outros aspectos. O critério de cura considerado pelo Ministério da Saúde é clínico e baseado na completa cicatrização das lesões com reepitelização do local, que deve acontecer até três meses depois do tratamento. Se não houver o desfecho esperado, o caso é considerado como recidiva e então um novo tratamento é iniciado (BRASIL, 2011 b). Estudos indicam que não há cura parasitológica na leishmaniose cutânea, podendo o parasito ser encontrado em pacientes curados clinicamente após vários anos (SCHUBACH et al., 1998; MENDONÇA, 2004).

Outro aspecto que merece atenção aponta à qualidade de vida das pessoas que estão envolvidas com esta enfermidade, onde a pobreza é um elemento primordial que contribui para sua disseminação, inclusive sendo considerada como principal fator para sua manutenção (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Em virtude das características epidemiológicas peculiares da LTA, as estratégias de controle devem ser flexíveis e distintas, adequadas para cada região endêmica ou foco epidêmico, em particular. A diversidade de agentes etiológicos, hospedeiros, vetores e de características ecológicas, aliadas ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários destes

aspectos, evidencia a complexidade do controle (BRASIL, 2007; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; 2003; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Estratégias que incluem a vigilância epidemiológica, com rápida identificação e tratamento dos casos, aliadas às medidas educativas promovendo a utilização de proteção individual e distanciamento das construções em relação à mata podem auxiliar a diminuição do número de casos, sobretudo em áreas consideradas endêmicas. Outro fator importante é a capacitação dos profissionais de saúde, para que tenham além da técnica, uma visão crítica e científica, auxiliando a população tanto na educação em saúde quanto na identificação de potenciais vetores e hospedeiros. Cabe ressaltar ainda, a importância do desenvolvimento de uma vacina que proporcione cobertura junto à população (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES, 2005; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana vem sendo documentada em praticamente todo o estado de Pernambuco, ampliando sua distribuição progressivamente, inclusive com a ocorrência de surtos epidêmicos em diversos municípios.

A amostra biológica utilizada para o diagnóstico da doença é majoritariamente a obtenção de uma biópsia da borda da lesão, procedimento extremamente invasivo e que apresenta riscos ao paciente, como a infecção do local examinado. Além disso, trata-se de um procedimento microcirúrgico, devendo ser realizado apenas por profissional médico em estabelecimentos de saúde de média e alta complexidade, necessitando, desta forma, o deslocamento de pacientes para estes locais. Ressalta-se, ainda, a inviabilidade da prática da coleta em crianças e em indivíduos nos quais as lesões localizam-se em áreas sensíveis do corpo.

Ao tratar-se de uma doença infecciosa, é necessária a identificação do parasito envolvido para que seja administrado o tratamento de forma pontual, sendo esta identificação realizada, dentre outros, por método parasitológico, através da pesquisa direta do parasito, ou por método molecular com a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Este último se constitui o mais apropriado para a identificação de *Leishmania* spp. por apresentar altas taxas de sensibilidade e especificidade, inclusive, tendo sido validado em pacientes do estado de Pernambuco, com a utilização do kDNA do parasito como alvo diagnóstico. Apesar da tímida utilização desta técnica no serviço de saúde, os centros de pesquisas vêm a utilizando amplamente, inclusive com investimentos para sua otimização, promovendo, desta forma, a redução de seus custos rapidamente, o que favorece a implantação gradual deste método em conjunto com as demais técnicas utilizadas na rotina.

Diante de sua manutenção, a LTA vem causando um grande impacto na saúde pública do Estado, sobretudo nas áreas endêmicas, e este fato aliado ao caráter crônico da doença, justifica o empenho em estudar um método não invasivo de coleta de amostras biológicas que possa auxiliar o diagnóstico de rotina da LTA, proporcionando conforto ao paciente durante a coleta e baixo risco de infecção subsequente, além de evitar que grande número de indivíduos infectados seja submetido ao procedimento de biópsia.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Qual o desempenho do método de coleta de *Leishmania* spp. através do swab para o diagnóstico molecular da LTA?

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o método de coleta de *Leishmania* spp. através do swab para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana utilizando a técnica de PCR.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes selecionados no período do estudo.
- b) Analisar o diagnóstico parasitológico da LTA, através da pesquisa direta em amostras de escarificação.
- c) Comparar o desempenho entre substratos (biópsia e exsudato cutâneo) no diagnóstico molecular da LTA.
- d) Analisar o desempenho do método de coleta através do swab para o diagnóstico molecular da LTA.

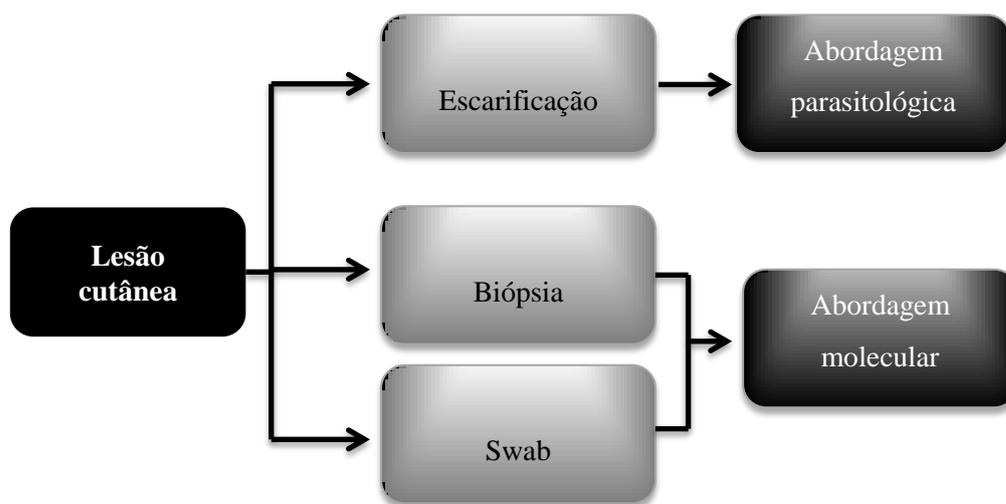
5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho experimental

Foi realizado um estudo descritivo, tipo série de casos, como forma de avaliar o desempenho do método swab para a coleta de amostra biológica humana no diagnóstico molecular da LTA em regiões endêmicas do estado de Pernambuco.

Com o intuito de comparar o desempenho do método de coleta proposto com o método de rotina, em cada paciente selecionado realizou-se a coleta de três amostras paralelamente: exsudatos cutâneos através do swab e biópsia para o diagnóstico molecular; e escarificação da lesão para a pesquisa direta de amastigotas (Figura 9).

Figura 9- Coleta de material biológico dos pacientes selecionados no estudo.



Fonte: Autora.

5.2 Seleção de Pacientes

Entre os meses de março de 2011 e junho de 2012, pacientes do Setor de Dermatologia do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC/ UPE), provenientes de áreas endêmicas de LTA no estado de Pernambuco e que apresentaram lesão cutânea sugestiva da doença ativa foram convidados a participar do estudo. Como critérios de inclusão, adotou-se o diagnóstico clínico-epidemiológico positivo para LTA e a aptidão do paciente para coleta das amostras. Foram excluídos do estudo crianças e indivíduos portadores de outras doenças cutâneas.

5.3 Coleta de amostras

5.3.1 Coleta de *Leishmania* spp. em swab

Exsudatos cutâneos presentes na superfície das lesões ulceradas foram coletados com auxílio de swabs sob condições estéreis. Cuidadosamente, o swab foi movimentado no leito da lesão em forma de ‘zig-zag’ de modo que exsudatos presentes em toda sua extensão (centro e borda) fossem coletados (Figura 10). Para a realização da coleta em lesões que não apresentaram exsudatos, precedeu-se imersão do swab em solução salina estéril (0,9 %), realizando-se posteriormente a coleta.

Em lesões crostosas, especialmente aquelas decorrentes de infecções secundárias, a lesão foi lavada com solução salina estéril, sendo então feita a retirada de uma pequena parte da superfície crostosa, preferencialmente de sua borda, com auxílio de lâmina de bisturi estéril, com bastante cuidado para que não houvesse sangramento. Posteriormente, realizou-se a coleta dos exsudatos cutâneos a partir do local exposto.

Após serem embebidos com os exsudatos, os swabs foram estocados em tubos de 1,5 mL e transportados para o laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/ FIOCRUZ), onde permaneceram à temperatura de - 4 °C até o seu processamento, realizado em 24 h após a coleta. Para este processamento, foi retirada a haste flexível do swab com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e utilizado apenas o substrato de algodão.

Figura 10- Coleta de exsudatos cutâneos através de swab bacteriológico.



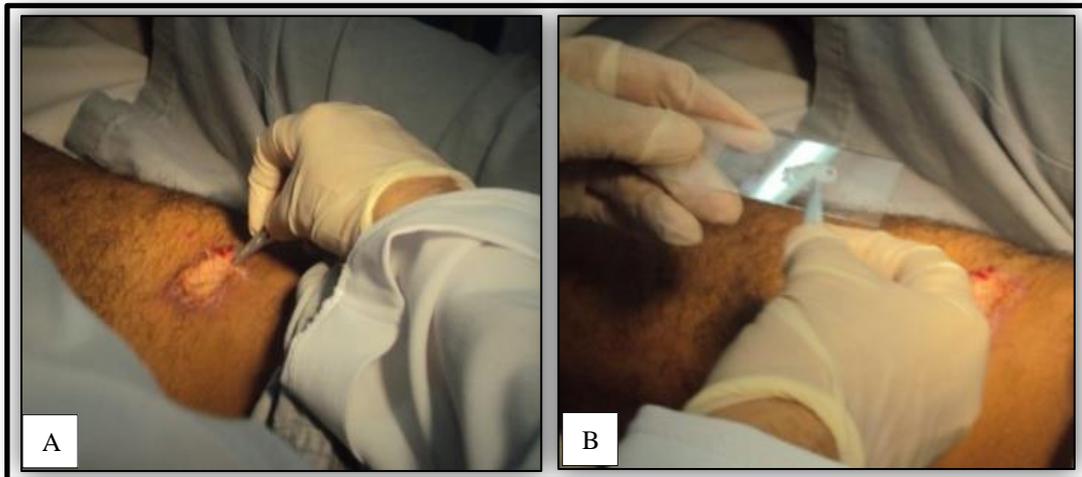
Fonte: Araújo (2011b).

Nota: (A) Coleta na borda da lesão. (B) Coleta no centro da lesão.

5.3.2 Escarificação

A escarificação foi realizada com auxílio de lâmina de bisturi estéril, sendo executados movimentos de raspagem na borda das lesões, previamente tratadas antissépticamente com solução salina estéril (0,9 %). O material retirado foi então posto em lâmina de microscopia em forma de esfregão. Na figura 11 observa-se o procedimento descrito.

Figura 11- Procedimento de escarificação da borda da lesão.



Fonte: Araújo (2011c)

Nota: (A) Escarificação com lâmina de bisturi. (B) Esfregão do material em lâmina de microscopia.

5.3.3 Biópsia

As biópsias cutâneas foram realizadas através de *punch* de 5 mm de diâmetro. Os fragmentos foram retirados da borda da lesão, após antissepsia com clorexidina e infiltração anestésica local com lidocaína (1 %), sob condições estéreis. Todos os procedimentos de obtenção de biópsia foram realizados no Serviço de Dermatologia do HUOC/ UPE por profissional médico e as amostras acondicionadas em tubos de 1,5 mL e transportadas para o laboratório de Imunoparasitologia (CPqAM/ FIOCRUZ), onde permaneceram a temperatura de - 70 °C até o seu processamento. Observa-se na figura 12 o procedimento de biópsia.

Destaca-se que os três procedimentos de coleta descritos seguiram esta mesma ordem de processamento no paciente: 1) coleta de exsudatos; 2) escarificação e 3) biópsia.

Figura 12- Obtenção de biópsia da borda da lesão cutânea com auxílio de punch.



Fonte: Araújo (2011d).

5.4 Diagnóstico clínico-epidemiológico

O diagnóstico clínico foi realizado pelo profissional médico através da anamnese, e baseou-se nas características da lesão associada aos dados epidemiológicos do paciente (procedência, faixa etária, ocupação e localização de residência).

5.5 Diagnóstico laboratorial

5.5.1 Abordagem parasitológica

Os esfregaços feitos em lâminas de microscopia com o material coletado pela escarificação foram fixados com álcool metílico absoluto e posteriormente corados pelo Giemsa. A pesquisa direta de amastigotas foi realizada através de microscopia óptica, na objetiva 100 x, com a utilização de óleo de imersão.

5.5.2 Abordagem molecular

5.5.2.1 Extração e purificação de DNA

A extração e purificação de DNA das amostras de exsudatos cutâneos e biópsias se baseou no protocolo estabelecido pelo QIamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA). Para aferição da pureza e concentração de DNA adequada à técnica de PCR, o DNA

genômico de todas as amostras foi quantificado através de espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific[®], modelo 2000 c).

5.5.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA contido nas amostras de biópsias e exsudatos foram submetidos à amplificação em um termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf). Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores específicos que permitem a amplificação do kDNA de *Leishmania* pertencente ao subgênero *Viannia* LEIB1 (5'- GGGTTGGTGTAATATAGTGG - 3') e LEIB2 (5' - CTAATTGTGCACGGGGAGG - 3') tendo como alvo de detecção moléculas de minicírculos inteiros (regiões conservada e variável) do kDNA do parasito, equivalente a 750 pb, de acordo com as condições descritas por De Bruijn e Barker (1992).

A PCR foi realizada em um volume final de 25 µL contendo Tris - HCl (10 mM), KCl (50 mM), gelatina (0,1 mg/mL), MgCl₂ (1,5 mM), dNTP (0,2 mM), 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores e 2,5 U da enzima Taq DNA Polimerase. A essa mistura foram adicionados 2 µL da amostra de DNA a ser analisada numa concentração igual ou superior a 10 µg/µL. A amplificação constituiu-se de 35 ciclos: 94 °C (1 min), 65 °C (1 min) e 72 °C (1 min) (ERESH; McCALLUM; BARKER, 1994), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C.

Além disso, um controle negativo (sem DNA) foi adicionado à reação, juntamente a dois controles positivos (10 µg/µL e 1 µg/µL) de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* oriundos da cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903).

5.5.2.3 Análise dos produtos da PCR

Após a amplificação, 10 µL dos produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0 % para o alvo de 750 pb com tampão TAE 1 x (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) e corados pelo brometo de etídeo a 0,05 µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas com o sistema Kodak[®], modelo Gel Logic 100 Imagem System.

5.6 Análise dos dados

Os dados obtidos foram processados e analisados através do programa estatístico EpiInfo, versão 6.0 e Excel® (Microsoft) para a construção de gráficos e tabelas. Para avaliar o nível da concordância dos testes realizados foi utilizado o índice Kappa.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto seguiu todos os preceitos éticos através da sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEP – CPqAM), sob o número 38/ 2008 (Anexo A). Cada indivíduo convidado a participar do estudo foi devidamente informado sobre a natureza do estudo e seu envolvimento na pesquisa e após a leitura e concordância assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Os laudos médicos foram entregues ao médico assistente e os pacientes foram encaminhados para a administração do tratamento adequado.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Perfil clínico e epidemiológico dos pacientes

Foram selecionados 88 pacientes com lesão de LTA, sendo a maioria destes (52/ 59,1 %) do sexo masculino e 36 (40,9 %) do sexo feminino. O município de Moreno, região metropolitana do Recife, foi o local de onde procedeu a maioria dos pacientes selecionados (80,7 %). Entretanto, também foram observados pacientes oriundos do município do Cabo e de Camaragibe, este último representado pelo seu distrito, Aldeia, ambos também localizados na região metropolitana do Recife; município de Amaraji, Zona da Mata Sul do Estado e Bonança, Zona da Mata Norte.

De acordo com a faixa etária acometida, foi observada prevalência da LTA em indivíduos adultos (≥ 30 anos), sendo a média de idade observada de 40,36 anos. É relatada na literatura maior prevalência em indivíduos do sexo masculino e na faixa etária menor do que a encontrada (BENICIO et al., 2011; BRITO et al., 2008; SILVA; MUNIZ; 2009).

As lesões foram mais prevalentes em áreas expostas do corpo, como membros inferiores (71,6 %) e membros superiores (20,45 %), embora tenham sido observadas, em alguns pacientes, lesões na cabeça e tórax. Estes dados são relatados com frequência na literatura, sendo facilmente associados à maior exposição destas áreas do corpo ao inseto transmissor (CASTRO et al., 2002; GOMES et al., 2008; ANDRADE et al., 2009). Destacase a identificação de um paciente diagnosticado como portador de leishmaniose disseminada (> 50 lesões) e outro soropositivo para o vírus HIV, entretanto, este último não apresentou sintomas da coinfeção.

De acordo com as características clínicas das lesões, foi observada predominância das lesões ulceradas (80/ 91 %) frente às lesões crostosa (7/ 7,95 %) e nodular (1/ 1,13 %). O tempo de evolução das lesões relatado pelos pacientes variou de oito dias a dois anos, sendo a média de 2,2 meses.

Foi observado que a maioria dos pacientes reside em área rural (63/ 71,59 %), sobretudo engenhos, o que revela a ocupação destes nas atividades agrícola e/ ou pecuária. Estas características são associadas comumente em áreas endêmicas para LTA, onde as pessoas estão constantemente expostas ao risco de transmissão, seja pelas atividades que desempenham ou local que residem. Estes hábitos constituem aspectos propícios à sobrevivência de hospedeiros reservatórios e vetores do parasito. Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes estudados estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes selecionados no estudo.

Características	Positivo* n = 79	Negativo* n = 9
<i>Sexo</i>		
Masculino	48	4
Feminino	31	5
<i>Idade** (anos)</i>		
≤ 15	8	0
16 – 30	20	1
31 – 50	25	4
51 – 60	13	2
≥ 61	12	1
<i>Habitação</i>		
Rural	58	5
Urbana	21	4
<i>Lesões</i>		
<i>Local</i>		
Membros inferiores	54	9
Membros superiores	19	0
Tórax	3	0
Cabeça	3	0
Todo o corpo (≥ 5)	1***	0
<i>Tipo</i>		
Ulcerada	71	9
Nodular	1	0
Crostosa	7	0
<i>Presença de exsudação</i>		
Sim	71	9
Não	8	0
<i>Evolução****</i>		
≤ 1 mês	38	3
2 meses – 2 anos	40	6

Fonte: Autora.

Nota: (*) Considerou-se aqui “positivo” paciente que obteve ao menos um dos testes laboratoriais positivo para leishmaniose tegumentar americana e “negativo” quando todos os testes realizados obtiveram resultado negativo.

(**) Um paciente não informou a idade. (***) Paciente diagnosticado com leishmaniose disseminada. (****) Um paciente não informou quanto tempo havia decorrido entre o surgimento da lesão e o dia da consulta.

7.2 Diagnóstico laboratorial

7.2.1 Abordagem parasitológica

Das 88 lâminas observadas pelo método de microscopia óptica, observaram-se formas amastigotas de *Leishmania* em 62 (70,45 %), enquanto que 26 (29,54 %) não as apresentaram. Estes resultados corroboram com Gomes et al. (2008) que relataram positividade de 69 % (36/52) em pacientes de área endêmica de São Paulo.

A dificuldade na visualização de *Leishmania* em microscopia ocorreu, devido, principalmente, a presença de infecções secundárias, sobretudo bacterianas, nas lesões. Além disso, este método requer habilidade do operador para a identificação do parasito de forma segura.

No presente estudo, não foi observada associação entre positividade das lesões e seu tempo de evolução, sendo encontradas formas amastigotas em lâminas de pacientes com lesão de aproximadamente dois anos. Dos 62 pacientes que foram positivos neste teste, foi observado tempo de evolução médio de 70,6 dias (pouco mais de dois meses). Já os que não apresentaram formas amastigotas (n = 25), tiveram tempo médio de evolução de 55,8 dias, variando de 15 dias a sete meses. De acordo com o tipo de lesão, a pesquisa direta mostrou-se eficiente, sendo o parasito detectado em lesões crostosas, nodulares e ulceradas (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação dos resultados da pesquisa direta provenientes de amostra de escarificação, em relação ao tipo de lesão, de pacientes de área endêmicas do Estado de Pernambuco entre os meses de março de 2011 a junho de 2012.

Tipo de Lesão	Pesquisa Direta	
	-	+
Crostosa	1	6
Nodular	0	1
Ulcerada	25	55

Fonte: Autora.

Nota: (+) Resultado positivo. (-) Resultado negativo.

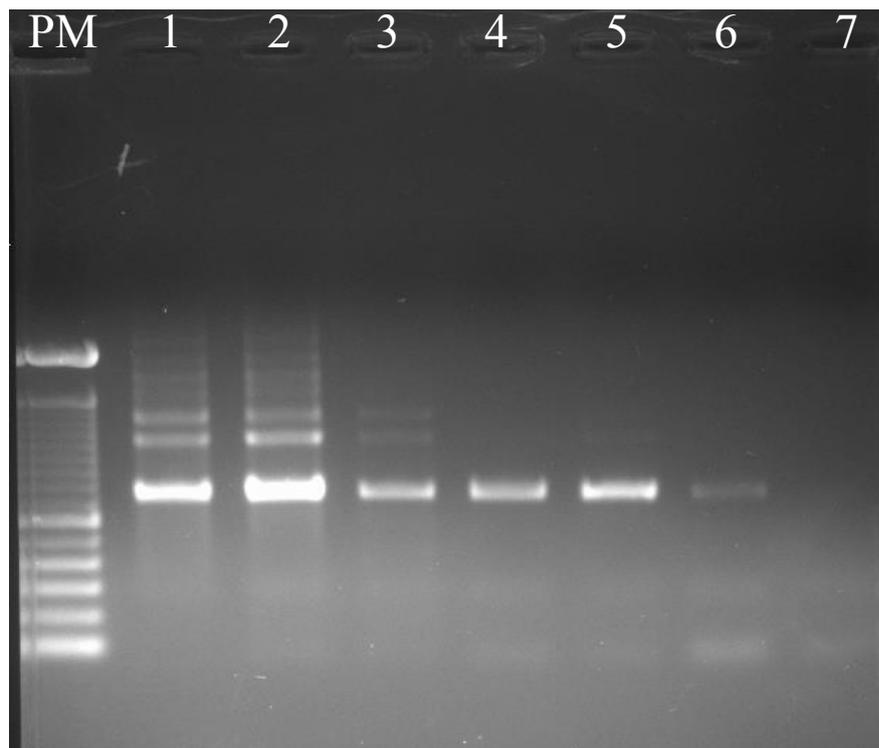
Apesar de ser um método rápido, apresentar baixo custo e ser recomendado pelo Ministério da Saúde como método de primeira escolha para o diagnóstico das leishmanioses (BRASIL, 2007), esta técnica apresenta diversas limitações como as apresentadas

anteriormente, além de necessitar de um tempo relativo para que o diagnóstico seja confirmado. Baseados em ensaios experimentais e clínicos, autores sugerem que não há um método padrão-ouro para a leishmaniose (MARQUES et al., 2006; POURMOHAMMADI et al., 2010; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2010), sendo concluído que um padrão-ouro deve ser o conjunto dos testes laboratoriais convencionais e suplementares associados ao diagnóstico clínico e epidemiológico (WEIGLE et al., 2002).

7.2.2 Abordagem molecular

Ao avaliar a sensibilidade da detecção de DNA de *Leishmania (Viannia) spp.*, foi obtido no presente estudo o limite de 10 fg/ μ L (Figura 13).

Figura 13- Eletroforese em gel de agarose a 1 % corado pelo brometo de etídeo, mostrando bandas específicas para *Leishmania (Viannia) braziliensis* com limite de detecção de 10 fg de DNA padrão.



Fonte: Autora.

Nota: PM (Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb, Invitrogen) (2072, 1500, 600, 100 pb), linhas 1 a 7 (concentrações de DNA: 10 ng/ μ L, 1 ng/ μ L, 10 pg/ μ L, 1 pg/ μ L, 100 fg/ μ L, 10 fg/ μ L e 1 fg/ μ L).

Todas as 176 amostras coletadas (88 de biópsia e 88 de swab) foram submetidas ao processo de purificação de DNA para o diagnóstico molecular por PCR. A comparação dos resultados do diagnóstico molecular a partir dos diferentes substratos revelou a

compatibilidade deles em 86,37 % (Tabela 4), sendo este dado estatisticamente significativo (valor $p = 0,001$).

Tabela 4- Comparação dos resultados da PCR provenientes de amostras de biópsia e exsudatos cutâneos de pacientes de área endêmica do Estado de Pernambuco entre os meses de março de 2011 a junho de 2012.

PCR		Quantidade de pacientes	%
Biópsia	Swab		
Resultados concordantes			
-	-	18	86,36
+	+	58	
Resultados discordantes			
+	-	10	13,64
-	+	2	
Total de amostras analisadas		88	100

Fonte: Autora.

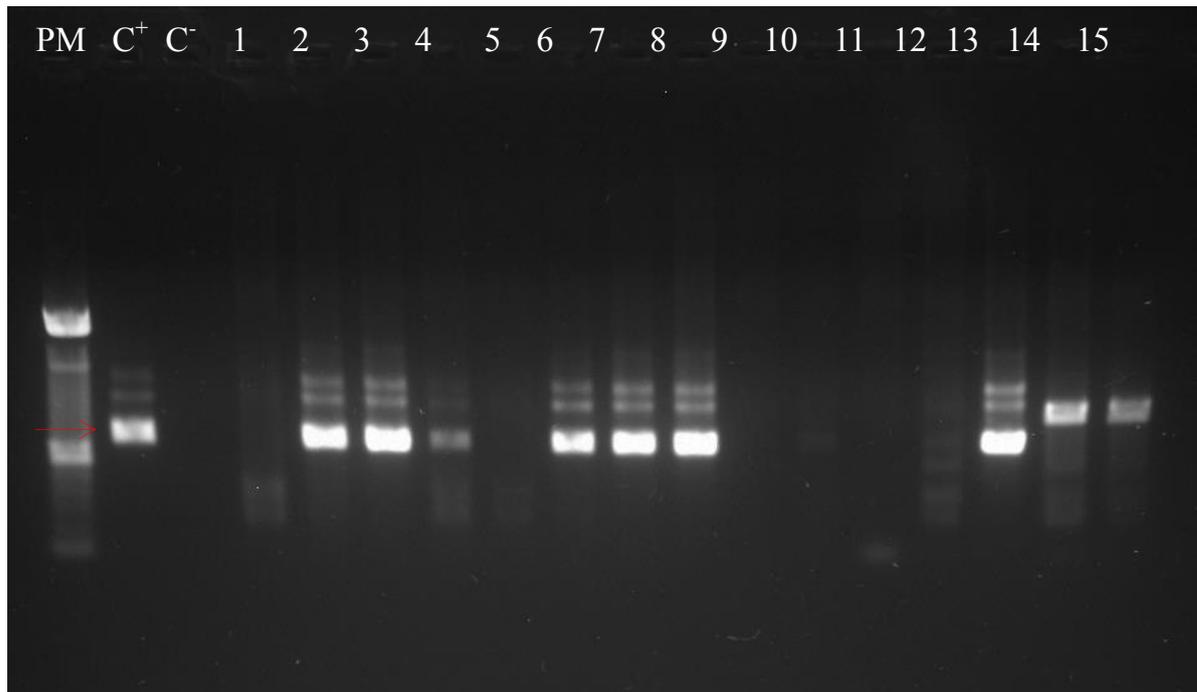
Nota: PCR - Reação em cadeia da polimerase. (+) Resultado positivo. (-) Resultado negativo.

A concordância entre o teste de PCR com os substratos swab e biópsia foi avaliada através do indicador Kappa (K), onde a máxima proporção de concordância não devida ao acaso é o máximo valor encontrado para k ($k=1$). Para o cálculo, dividiu-se o número total de observações concordantes pelo número total de observações. O valor obtido a partir desta análise foi de 0,66, o que de acordo com Landis e Koch (1977), é considerado substancial. Este índice demonstra a eficácia significativa da técnica de coleta por swab em relação à biópsia.

Amostras de 58 pacientes apresentaram resultado positivo tanto na biópsia quanto no swab e 18 apresentaram compatibilidade de resultados negativos nos dois substratos. Assim, dos 88 pacientes que tiveram suas amostras analisadas, 76 apresentaram o mesmo resultado, independente do tipo de amostra utilizada para o diagnóstico. Em contrapartida, dez deles apresentaram resultado positivo somente na biópsia, enquanto que dois foram positivos apenas no swab. Na figura 15 observam-se produtos amplificados de amostras provenientes de swab e na figura 16, amostras positivas e negativas provenientes de biópsia e swab.

A divergência dos resultados em 12 pacientes, onde se observa em dez deles positividade apenas nas amostras de biópsia, pode ser explicado por possíveis dificuldades durante a obtenção dos exsudatos cutâneos ou por não haver, no momento da coleta, quantidade substancial de parasitos na sua superfície, uma vez que esta quantidade é inversamente proporcional à duração da infecção (RODRIGUEZ et al., 1994).

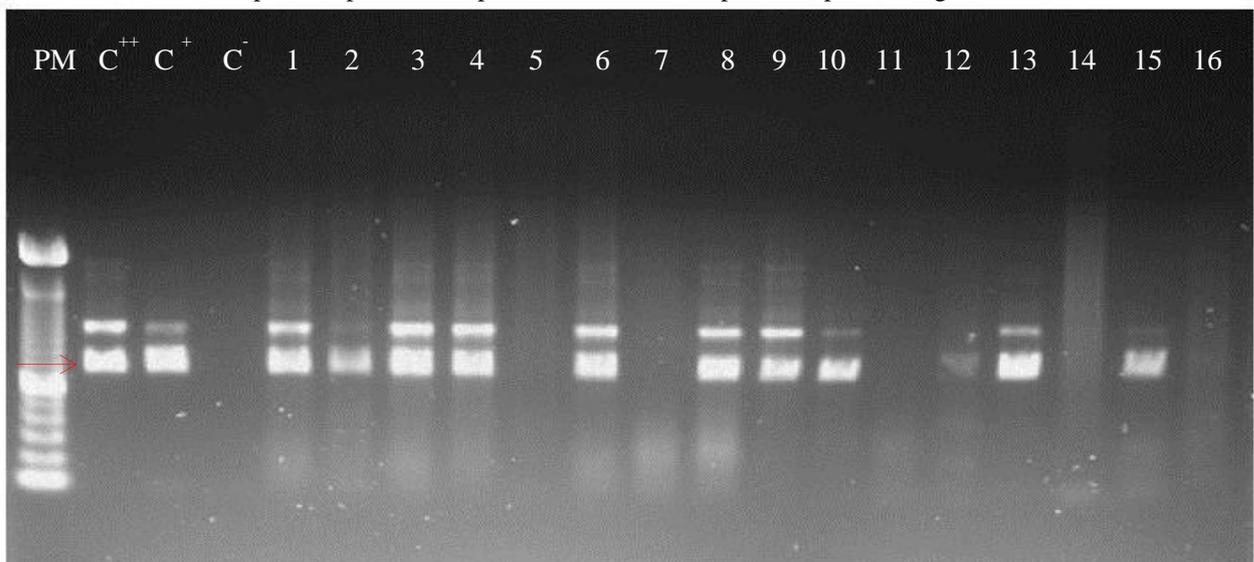
Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de swab amplificado a partir de iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.



Fonte: Autora.

Nota: (PM) Marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb, Invitrogen - 2072, 1500, 600, 100pb. (C⁺) Controle positivo -1ng/μL. (C⁻) Controle negativo - sem DNA. (2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 e 13) Amostras de DNA provenientes de swab positivas. (1, 5, 9, 11, 12, 14 e 15) Amostras de DNA provenientes de swab negativas. O produto de amplificação do fragmento de 750 pb encontra-se indicado por seta.

Figura 15 - Eletroforese em gel de agarose a 1% corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de swab e biópsias amplificados a partir de iniciadores específicos para o subgênero *Viannia*.



Fonte: Autora.

Nota: (PM) Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb, Invitrogen - 2072, 1500, 600, 100 pb. (C⁺⁺) Controle positivo forte - 1 ng/μL. (C⁺) Controle positivo fraco - 10 pg/μL. (C⁻) Controle negativo - sem DNA. (1, 2, 3, 4, 6) Amostras de DNA provenientes de biópsias positivas. (8, 9, 10, 12, 13, 15) Amostras de DNA provenientes de swab positivas. (5, 7, 11, 14, 16) Amostras negativas. O produto de amplificação do fragmento de 750 pb encontra-se indicado por seta.

Quanto aos dois pacientes que apresentaram resultado positivo no swab, mas negativo na biópsia, é possível sugerir que, embora o procedimento de biópsia consiga obter uma maior quantidade de substrato em relação ao swab, que neste caso, dependerá da disponibilidade de exsudato cutâneo, ele não assegura a captação de grande quantidade de parasitos, uma vez que estes não se encontram dispostos de forma uniforme na lesão, podendo existir áreas da lesão onde não haja a presença de *Leishmania*, o que pode conduzir um resultado falso-negativo.

Neste quadro, a coleta com o swab assegura que exsudatos presentes em toda a área da lesão sejam coletados, incluindo aqueles que estejam concentrados no centro da lesão, onde é praticamente impossível efetuar a remoção de fragmentos por intermédio da biópsia, embora seja este o local onde se acredita ter uma grande concentração de *Leishmania* disponível.

Desta forma, ao mesmo tempo em que não se pode garantir que nos exsudatos cutâneos haja a presença do parasito e sua consequente detecção, assim como não se garante que no fragmento de biópsia também o tenha, na coleta com o swab pode-se ter a garantia de que exsudatos cutâneos de toda a área da lesão, não somente de um único local de sua borda serão coletados, aumentando, conseqüentemente, a probabilidade da captação do parasito.

Os métodos desenvolvidos no presente estudo seguiram a sequência empregada na rotina laboratorial, com exceção do método de swab. A coleta de exsudatos foi a primeira a ser realizada, seguida pela escarificação e posteriormente a biópsia. Este procedimento operacional foi desenvolvido para que fosse garantida a integridade da lesão para a coleta da biópsia sendo importante não somente para o diagnóstico molecular como também para o diagnóstico diferencial, e para que os demais métodos não sofressem interferências provenientes da biópsia, como sangramento, caso esta última fosse realizada em primeiro momento. A opção por esta sequência no emprego dos diferentes métodos foi baseada na discussão acerca da disponibilidade de parasitos na lesão, pois, a partir do momento em que a biópsia obtém uma maior quantidade de tecido, pode-se possivelmente, prejudicar a disponibilidade de *Leishmania* para as outras coletas.

A utilização de exsudatos cutâneos torna-se relevante como uma ferramenta auxiliar para a coleta biológica de rotina, sobretudo em casos especiais, quando as lesões estão localizadas na face do paciente ou em outras áreas sensíveis, nas quais o procedimento de biópsia apresente-se inadequado. O método proposto no presente trabalho permite ainda que os pequenos centros de saúde possam realizá-lo de forma rápida e, por conseguinte, fornecer material para o diagnóstico definitivo com maior facilidade.

Considerando a praticidade e simplicidade desta coleta, de forma que profissionais técnicos da saúde possam executá-lo, há uma probabilidade de que um maior número de

amostras possa ser coletado num menor espaço de tempo, quando comparado com o procedimento de biópsia, pois este último necessita, como parte de sua execução, da aplicação de anestesia local e, conseqüentemente, de um profissional médico responsável, uma vez que, ao se tratar de um procedimento cirúrgico que objetiva a retirada de um fragmento do órgão cutâneo, dependendo do local lesionado, da evolução da lesão e das características clínicas observadas, pode haver complicações posteriores, como sangramento e infecção do local. Desta forma, proporciona ao paciente um elevado desconforto, sendo por vezes, a razão da recusa ao diagnóstico.

Neste contexto, observa-se ainda o tempo de recuperação necessitado pelos pacientes após serem submetidos ao procedimento de biópsia. É recomendada, em muitos casos, a administração de antibióticos e o repouso por alguns dias (a depender do local lesionado). Estas recomendações privam ainda mais o conforto e o bem estar de pacientes portadores da leishmaniose cutânea e suas variações.

Mimori et al. (2002) demonstraram, pela primeira vez, a utilidade do swab para o diagnóstico de leishmaniose cutânea, no entanto, naquele estudo, houve utilização de lâmina de bisturi para a remoção de exsudados cutâneos antes do emprego do swab. Embora a prática do uso da lâmina de bisturi seja comum para a escarificação cutânea, observa-se, nesta associação de ferramentas, a fácil possibilidade de sangramento no centro da lesão, o que favorece a captação de sangue além do exsudato cutâneo presente, sendo este um fator de confusão quando se questiona qual o substrato cujo parasito estava presente. Não obstante, promove maior facilidade de inflamação por expor ainda mais o local injuriado a microorganismos patogênicos, embora se apresente menos invasivo quando comparado ao da biópsia.

Garcia et al. (2007) descreveram a utilização de palitos de madeira estéreis para a coleta de material biológico a partir das lesões de leishmaniose com vistas ao diagnóstico da doença, sendo, este material, pequenos fragmentos superficiais de tecido cutâneo. Este estudo foi desenvolvido com 44 pacientes da Bolívia e, com a utilização da técnica hsp70 PCR RFLP, apresentou 95 % e 100 % de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Apesar de ser considerada não invasiva, tal prática pode oferecer riscos iminentes para as lesões ativas, principalmente pelo fato de a ferramenta possuir a extremidade pontiaguda, o que, ao menor movimento do paciente ou do operador, pode dar seguimento ao agravamento da ferida.

Recentemente, autores descreveram a utilização do swab para o diagnóstico da LV em cães, através da coleta de material da conjuntiva destes animais (FERREIRA et al., 2008;

2012; LEITE et al., 2010, 2011; PILATTI et al., 2009; STRAUSS-AYALI et al., 2004). Essa prática auxilia o diagnóstico da LV em cães pela praticidade da coleta, uma vez que o diagnóstico de rotina é realizado principalmente através de material da medula óssea dos animais. A coleta por swab neste caso propicia maior rapidez na coleta, conforto aos animais e, sobretudo, priva-os dos riscos inerentes ao procedimento de punção medular.

O método proposto no presente estudo é utilizado geralmente para verificar a presença e gravidade de infecções secundárias, especialmente as bacterianas (VERA; SANTOS; MACÊDO, 2001) nas lesões de leishmaniose cutânea. No entanto, embora o procedimento descrito para esta abordagem seja rápido e simples, podendo captar uma grande variedade de microorganismos presentes na superfície da lesão e, sobretudo, de forma não invasiva, nada foi discutido acerca de sua utilização para o diagnóstico da doença, com exceção da utilização prévia de lâmina de bisturi, como descrito anteriormente (MIMORI et al., 2002).

Associado aos vários métodos de coleta, a técnica de PCR tem se tornado cada vez mais popular devido à sua alta sensibilidade, rapidez e eficiência em comparação com outros métodos, e oferece novas possibilidades e alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose (DE BRUIJN et al., 1993; RODGERS; POPPER; WIRTH; 1990; WILSON, 1995). Numerosos estudos demonstram a aplicabilidade desta técnica em estudos de diagnóstico da doença (DE OLIVEIRA et al., 2011; FAGUNDES et al., 2010; FELIPE et al., 2011; FERREIRA et al., 2010; LIMA-JÚNIOR et al., 2009; NEFFATI et al., 2011; ROELFSEMA et al., 2011).

A técnica de PCR utilizada no presente estudo foi validada em amostras clínicas no estado de Pernambuco por Rodrigues et al. (2002) que demonstraram sensibilidade e especificidade de 94,3 % e 100 %, cujos intervalos de confiança são 86,5 – 97,9 % e 86,3 – 100 %, respectivamente. A utilização do kDNA de *Leishmania* como alvo diagnóstico apresentou excelente eficiência, por estar presente em inúmeras cópias na célula, facilitando desta forma, a sua detecção.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se afirmar que a coleta de exsudados cutâneos por swab é eficaz quando comparado ao método de biópsia, sendo uma excelente opção no auxílio no diagnóstico molecular da LTA em áreas endêmicas, haja vista a praticidade de execução, e o fato de não ser um método invasivo, contribuindo para o menor número de pacientes submetidos ao procedimento de biópsia e consequentemente promovendo menos danos à sua saúde.

8 CONCLUSÕES

a) O método de coleta através do swab apresentou-se eficaz para o diagnóstico molecular da LTA em vários tipos de lesões, superando a impossibilidade de realização da biópsia cutânea em situações cujas lesões encontram-se localizadas em áreas sensíveis do corpo, e demonstra potencial de aplicação no diagnóstico da doença em serviços de saúde.

b) O perfil epidemiológico dos pacientes indicou a prevalência da doença em indivíduos do sexo masculino, residentes de áreas rurais e as lesões foram observadas em sua maioria nos membros inferiores.

c) O diagnóstico molecular por PCR através dos substratos analisados apresentou maior positividade em relação ao diagnóstico parasitológico direto, apresentando também melhor nível de automação.

d) A comparação do resultado do diagnóstico molecular entre os substratos biópsia e swab revelou elevado índice de concordância, apresentando-se estatisticamente significativo.

REFERÊNCIAS

- ALVAR J.; YACTAYO, S.; BERN C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 1-12, 2012.
- ALVES, A. L. L. Uso do 'swab' de algodão para colpocitologia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 401-405, 1999.
- ALVES, R. et al. Biópsia cutânea: onde, quando e como? **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, Madrid, v. 39, p. 3-12, 2011.
- ALMEIDA, I. A. Z. C. et al. Coqueluche: avaliação de 10 anos de diagnóstico laboratorial na região Noroeste do Estado de São Paulo, 2001-2011. **Boletim Epidemiológico Paulista**. São Paulo, v. 8, n 90, 2011.
- AMATO, V. S. et al. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Baltimore, v. 77, p. 266-274, 2007.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**. Nova Iorque , v. 35, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Uberaba, v. 38, p. 229-33, 2005.
- ANTONIO, C. R.; TIMPANO, D. L.; GARCIA, A. C. **Biópsia**. Disponível em: <<http://antoniarononlugo.com/blog/wp-content/uploads/2010/05/72-BIOPSIAS11.pdf>>, Acesso em: 12 jan 2012.
- ARAÚJO, A. I. F. **Métodos de coleta de amostras biológicas utilizadas na rotina laboratorial para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar**. Recife, 2011a. 4 fotografias.
- ARAÚJO, A.I.F. **Coleta de exsudatos cutâneos através de swab bacteriológico**. Recife, 2011b. 2 fotografias.
- ARAÚJO, A.I.F. **Procedimento de escarificação da borda da lesão**. Recife, 2011c. 2 fotografias.
- ARAÚJO, A.I.F. **Obtenção de biópsia da borda da lesão cutânea com auxílio de punch**. Recife, 2011d. 1 fotografia.
- AREVALO, J. Diagnóstico laboratorial da infecção por *Leishmania* sp. In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1 ed. Salvador: Contexto, 2011, cap. 14. p. 146-153.

- ARIAS, J.R.; NAIFF, R.D. The principal reservoir host of cutaneous leishmaniasis in the urban areas of Manaus, Central Amazon of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 76, p. 279-286, 1981.
- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14. p. 523-532, 1996.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, Nova Iorque, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- AVILA-PIRES, F. D. Ecologia das Zoonoses. In: COURA, J. R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap 5, p. 53-63.
- BANULS A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, Londres, v. 64, p. 1-109, 2007.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D. Leishmaniasis in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* reduces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 44, p. 536- 546, 1991.
- BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, Cambridge, v. 99, p. 125-146, 1989.
- BARKER D. C.; BUTCHER J. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 77, p. 285-297, 1983.
- BASANO S. A.; CAMARGO L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, p. 328-337, 2004.
- BEENAL K.R.; RAMESH, V.; MUKHERJEE, A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v. 30. p. 616-620, 2003.
- BENICIO, E. A., et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 1141-1144, 2011.
- BERRAHAL, C.F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, p. 273-277, 1996.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica.: Coqueluche. In: _____. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave**. Brasília, 2006.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2007.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Orientações sobre a utilização da Anfotericina B para o tratamento de pacientes com as leishmanioses**. Brasília, 2011a. (Nota técnica nº 52, de 21 de outubro de 2011).

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com coinfeção *Leishmania*/HIV**. Brasília, 2011b.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 445-449, 1994.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 93, p. 488-494, 1999.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 97, p. 291-296, 2003.

BRYCESON, A. D. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Treatment. III. Immunological studies. IV. Pathogenesis in DCL. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 64, p.369-374, 1970.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 7, p. 318-321, 2000.

BRITO, M. E. F. et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, p. 2445-2448, 2008.

CASTRO, M. C. A. **Caracterização imunofenotípica em linfócitos do sangue periférico de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana**. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

CASTRO, E. A. et al. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a 1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, p. 445-452, 2002.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. **Parasites - Leishmaniasis, Biology, Life Cycle**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>, Acesso em: 10 dez 2012.

CHANG, K. P.; BRAY, R. S. Leishmaniasis. In: _____. **Human parasitic disease**. v. 1 Oxford: Ed: K.-P., 1985, p.140-141.

CHAVES L. F. et al. Sources and sinks: revisiting the criteria for identifying reservoirs for American cutaneous leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 23. n. 7. p. 311-316, 2007.

CORVALAN, F. H. et al. DNA identification of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 17. n. 1. p. 98-102, 2011.

COSTA, J. M. L. Leishmaniose tegumentar americana: Origens e histórico no Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 22, n. 1, p. 71-77, 1992.

COSTA, J. M. L. Cura espontânea de lesão causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 4, p. 205-208, 1992.

COSTA, J. M. L. Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. **Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas**. 1 ed. Salvador: Contexto, 2011, cap. 13, p. 137-145.

COSTA, J. M. L., et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose Tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, n.79, p.70-83, 2009.

CONVIT, J.; KERDEL-VEGAS, F.; GORDON, B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. **Britanic Journal of Dermatology**, Londres, v.74, p.132-35, 1962.

COURRET, N. et al. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different processes and status protection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, Nova York, v 33. p. 1373-83, 2003.

CUBA CUBA, C. A. et al. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. **Epidemiological Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v. 15, n. 3, p. 249-259, 1981.

CUBA CUBA, C. A. et al. Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 80. p. 456-457, 1986.

DA-CRUZ, A.M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: COURA. J.R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 697-712, 2005.

DANTAS-TORRES, F., et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 11, n. 61, p. 32-40, 2006.

DASGUPTA, S. et al. A cloned kinetoplast DNA minicircle fragment from *Leishmania* spp: specific for post kala-azar dermal leishmaniasis strains. **Parasitology**, Londres, v. 102. p. 187-191, 1991.

DE BRUIJN, M. H. L. et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v. 44, p 201-207, 1993.

DE BRUIJN, M. H. L.; BARKER, D. C. Diagnosis of new world leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Cambridge, v. 52, n. 1, p. 45-58, 1992.

DE OLIVEIRA, C. I. et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.37, p.149-153, 2003.

DE OLIVEIRA, D. M. et al. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 15, p.204-210, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative, Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, Oxford, v. 27. n. 5. p. 305-318, 2004.

EBOS Healthcare. **Paramount Biopsy Punch 8mm**. Nova Zelândia, 2013. Disponível em: <https://online.ebos.co.nz/default.cfm?action=displayproduct&product_code=26710080>. Acesso em: 29 mar 2013.

EDRISSIAN, G. H. et al. Bacterial infections in suspected cutaneous leishmaniasis lesions. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v.68, p.473-477, 1990.

ERESH, S.; MCCALLUM, S. M.; BARKER, D. C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, Londres, v.109, p.423-433, 1994.

FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral center. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 109-112, 2010.

FELIPE, I. M. A. et al. *Leishmania* infection in humans, dogs and sandflies in a visceral leishmaniasis endemic area in Maranhão, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, p. 207-211, 2011.

FERNANDES O., et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania* (*Viannia*) species. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 3, p. 563-568, 1999.

FERREIRA, A. C. et al. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, p. 895-898, 2010.

FERREIRA, S. A. et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, p. 257-263, 2008.

FERREIRA, S. A. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, e1596, 2012.

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.99, p.105-111, 2001.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 214-221, 2006.

FURTADO T. Critérios para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 65, p. 51-86, 1994.

GARCIA A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 4. p. 368-371, 2007.

GHOSN S. H; KURBAN A. K. Leishmaniasis and other protozoan infections In: WOLFF, K. et al., editors. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**.v. 11, 7 ed, Nova Iorque : McGraw Hill, p. 2001-2009, 2008.

GONÇALVES, E. G. R. et al. Infecção bacteriana na leishmaniose cutânea: padrão bacteriano e sensibilidade a antibióticos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, p.219-2212, 2009.

GONTIJO B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Review**, Londres, v. 15, n. 2, 2009.

GOMES, A. C. et al. Ecologic aspects of american tegumentary leishmaniasis. 6. Anthropophilic Phlebotomus fauna of residual forests located in the northeastern region of the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 31. p. 32-39, 1989.

GOMES, A. H. S. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Detection by PCR biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 119, p. 319-324, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, Londres, v. 8, p. 419-433, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, p. 293-307, 2012.

GRAMICCIA M. et al. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. **Parasitology**, Londres, v. 105. p. 29-34. 1992.

GUIMARÃES, V. C. F. V. **Avaliação da infecção natural de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) por *Leishmania* spp. no Município de São Vicente Férrer**. 2011. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2011.

HAYDON D. T. et al. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 8, n. 12, p. 1468-1473, 2002.

HOMMEL, M. et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 72, p. 213-218, 1978.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil. I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis. Incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the lower Amazonian basin. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 62, n. 3, p. 385-395, 1968.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, Londres, n. 28, p. 44-48, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. **Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v. 7. n. 4, p. 1-19, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.) **The leishmaniasis in Biology and Medicine**, v. 1. Londres: Academic Press, 1987, p. 1-120.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasyurus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64. n. 1. p. 3-9, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: COLLIER, L., BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Ed). **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases**, v. 5, 9 ed. Londres: Arnold, 1998, p. 241-266.

LAINSON, R. et al. Leishmaniasis in Brazil: XVI Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of "pian-bois". **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 75, n. 4, p. 530-536, 1981.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, p. 159-174, 1977.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, Londres, v. 1, p. 1252-1254, 1903.

LEISHMANIOSE tegumentar americana em Pernambuco. **Boletim epidemiológico**, Recife, ano 1, n. 3, 2002.

LEITE, R. S. et al. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab sample. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 170, p. 201-206, 2010.

LEITE, R. S. et al. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia e Veterinária**, São Paulo, v. 20, p. 36-41, 2011.

LIMA, E. B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 82, p.111-124, 2007.

LIMA-JUNIOR, M. S. C. et al. Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 303-308, 2009.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4; e912, 2010.

MADEIRA, M. F. et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 100, n. 12, p. 442-5, 2006.

- MANOCHA, D.; BANSAL, N.; FARAH, R. S. Types and Selection Criteria for Various Skin Biopsy Procedures. In: KHOPKAR, U. (Ed.). **Skin Biopsy – Perspectives**. Rijeka: InTech. 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-perspectives/types-and-selection-criteria-for-various-skin-biopsy-procedures>> Acesso em: 10 jul 2012.
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espúndia” Escomel, 1911). **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 80, p. 859-876, 1986.
- MARZOCCHI, M. C. A. et al. Reação de imunofluorescência indireta e intradermorreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1974 e 1978. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 22, p. 149-155, 1980.
- MARQUES, M. J. et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 54, p. 37-43, 2006.
- MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 5/6, p. 82-104, 1992.
- MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. LTA: do histórico aos dias de hoje. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 4, p. 329-336, 1999.
- MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure?. **The Journal of Infectious diseases**, Chicago, v. 189, p. 1018-1023, 2004.
- MENDONÇA, S. C. et al. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, p. 347-355, 1988.
- MENZEL, S.; BIENZEL, V. Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the world. **Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v.29, p.194, 1978.
- MIMORI T. et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, Basel, v. 81, p. 197-202, 2002.
- MONTENEGRO J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilology**, Chicago, v. 13, p. 187, 1926.
- NAIFF, R. D. et al. Aspectos epidemiológicos de uma *Leishmania* de tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA, 11, 1989, Rio de Janeiro. **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, Rio de Janeiro, p. 84, 1989.
- NAVIN T.R.; ARANA, F. A.; DE MÉRIDA, A. M. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of the diagnostic. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p. 36-42, 1990.

NEFFATI, A. et al. Choix des amorces : élément déterminant dans le diagnostic moléculaire de la leishmaniose cutanée. **Pathologie Biologie**, Paris, v. 59, p. 119–123, 2011.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NICOLLE, C. Culture de parasite du bouton d'orient. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v.146, p.842, 1908.

NOVY, F. G.; McNEAL, W. J. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. A preliminary Note. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 1, p. 1-30, 1904.

OLIVEIRA, M. C. et al. Óbito em caso de leishmaniose cutaneomucosa após o uso de antimonial pentavalentes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 258-260, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: 27 out. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: 08 jul 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Control of leishmaniasis. **Report of a meeting of the WHO Expert Committee**. Geneve: WHO Technical Report Series, v. 949. p. 1-186, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 20 dez 2011.

PENNISI, M. G. et al. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 29, suppl. 2, p. 301-303, 2005.

PILATTI, M. M. et al. Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 87, p. 255-257, 2009.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, Londres, v. 82, p. 649-657, 2006.

PITA-PEREIRA, D. et al. First report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a periurban area of South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 80, p. 593-595, 2009.

PITA-PEREIRA, D. et al. SYBR Green-based Real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, Londres, n. 5, v. 15, 2012.

POURMOHAMMADI, B. et al. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 5, p. 1-8, 2010.

- PRASAD, R. et al. Miltefosine: An oral drug for Visceral Leishmaniasis. **Indian Journal of Pediatrics**, Calcutta, v. 71, p. 143-144, 2004.
- RANASINGHE S. et al. A real time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene**, Londres, v. 102, n. 9, p. 875-882, 2008.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das Leishmanioses: Transmissores de Leishmaniose Tegumentar Americana. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**, Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003, p. 291-309.
- RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, Nova Iorque , v. 17, n. 3, p. 177-190, 1987.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous Leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, Nova Iorque, v. 7, p. 581-596, 2007.
- REMME, J. H. F. et al. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, p. 421-426, 2002.
- REY, L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- ROCHA, R. D. R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.11. n. 2. p. 156-166, 2006.
- ROCHA, L. S. et al. Survey of natural infection by *Leishmania* in sand fly species collected in southeastern Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 104, p. 461-466, 2010.
- RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque , v. 71, p. 267-275, 1990.
- RODRIGUES, E. H. G. **Validação de abordagens moleculares para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco**. 2000. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2000.
- RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 10, p. 3572-3576, 2002.
- RODRIGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n. 9, p. 2246-2252, 1994.

RODRIGUEZ N. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: a new minicircle class exclusive to this specie isolated from a DNA cosmid library useful for taxonomic purposes. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 94, n. 3, p. 143-149, 2000.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. *Leishmania* Infection: Laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, p. 251–256, 2010.

ROELFSEMA, J. H. et al. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of *Leishmania* patients. **Experimental Parasitology**, Nova Iorque, v. 127, p. 36–41, 2011.

ROGERS, L. Preliminary note of development of *Trypanosoma* in cultures of the Cunningham-Leishman-Donovan bodies of cachexial fever and kalazar. **Lancet**, Londres, v.ii, p. 215-216, 1904.

ROMERO, G. A. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.65, p. 456-65, 2001.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by *Leishman* and *Donovan*. **British Medical Journal**, Londres, v. 2, p. 1261-1262, 1903.

SALEM, J. I. et al. PKO - Alternative method for isolating mycobacteria from sputum. **Acta Amazonica**, Manaus, v.37, p. 419-424, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAVANI, E. S. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 229-33, 2004.

SCHRIEFER A.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Londres, v.21, p.483-488, 2008.

SCHUBACH, A. et al. Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.58, p. 824-827, 1998.

SHAW, J. J. et al. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Leishmania) shawi* in Pará State. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 66, n. 6, p.243-246, 1991.

SHAW, J. J. et al. Transmissão de colaboradores agentes: Os flebotomíneos brasileiros como hospedeiros e vetores de determinadas espécies. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p. 337-351.

SHAW J. J. Animal reservoirs of *Leishmania* in different ecological situations and their importance in the epidemiology of the disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83. p. 486-490, 1988.

SHAW, J. J. Leishmanial Taxonomy: A never ending academic challenge In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1a ed. Salvador: Contexto, 2011, cap. 02, p. 06-10.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil X. Some observations on intradermal reaction to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 69, p.323, 1975.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Ecology and epidemiology: New World. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, v. 1, Nova York: Academic Press, 1987, p.291-363.

SILVA, N. S.; MUNIZ, V. D. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Acre, Amazônia brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 1325-1336, 2009.

SILVEIRA, F. T. et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae) no Estado do Pará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 18-22, 1991.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41. p. 363-82, 1987.

SINGH, S. Diagnosis of Leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, p. 311-330, 2006.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of Leishmaniasis. **Journal Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, p. 55-60, 2003.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). **Leishmaniose tegumentar americana**: Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 11 jul 2012.

SOTO, J. et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 78, p. 210–1, 2008.

SPITHILL, T. W.; GRUMONT, R. J. Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.12, p. 217-36, 1984.

STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of Infectious**

Diseases, Chicago, v. 189, p. 1729-1733, 2004.

STUART K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 9. p. 93-104, 1983.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 42, n. 5, p. 608-613, 2006.

TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149. n.3-4, p. 280-284, 2007.

TUON, F. F. et al. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. **Clinical Immunology**, Orlando, v.128, p.442-446, 2008.

YOSHIDA, E. L. A. et al. Human, canine and quine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis braziliensis*) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 1, p. 133-134, 1990.

YOUNG, D.; DUNCAN, M. **Guide to the Identification and Geographic Distribution of Lutzomyia Sand Flies in Mexico, The West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)**. United States of America: American Publishers, 1994.

VALE, E. C. S.; FURTADO, C. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 421-428, 2005.

VENDRAME, C. M., et al. Insulin-like growth factor-I induced and constitutive arginase activity differs among isolates of *Leishmania* derived from patients with diverse clinical forms of *Leishmania braziliensis* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.104, p. 566-568, 2010.

VERA, L. A.; SANTOS, J. B.; MACÊDO, V. O. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 34, p. 233-237, 2001.

WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, p. 489-496, 1987.

WEIGLE, K. A. et al. PCR-Based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 601-606, 2002.

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, Liverpool, v. 85. p. 95-100, 1995.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Aggeu MagalhãesComitê de Ética
em Pesquisas

Título do Projeto: Validação do método Swab para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de área endêmica de Pernambuco, Brasil.

Pesquisador responsável: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues

Instituição onde será realizado o projeto: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ)

Data de apresentação ao CEP: 20/05/2008

Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 41/08

Registro no CAAE: : 0040.0.095.000-08

PARECER Nº 38/2008

Após apreciação e aprovação do relatório parcial emitido pelo pesquisador responsável onde o mesmo solicita a extensão do prazo da pesquisa com justificativa bem fundamentada, o Comitê avaliou que o projeto em questão está condizente com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado de acordo com o protocolo de pesquisa que foi apresentado ao CEP e este parecer tem a validade até 22 de julho de 2014. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 22 de julho de 2011

Dra. Giselle Camposana Gouveia

Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ



APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Fundação Oswaldo Cruz – Ministério da Saúde



Centro de Pesquisas

AGGEU MAGALHÃES

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente

Projeto: “Padronização do método Swab para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de área endêmica de Pernambuco, Brasil”.

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é melhorar o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana a partir de um método que não utiliza material que corte a pele, para identificação de *Leishmania* spp.

Como faço parte do grupo de pacientes, serei submetido a coleta de leishmanias com a utilização de hastes flexíveis (cotonetes), sob condições estéreis, em toda a área da lesão. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-lo.

A presente proposta contribui para um melhor conhecimento da doença e diagnóstico mais rápido da leishmaniose tegumentar humana. Esse projeto levará a um tratamento mais rápido, com benefícios para o paciente, sendo considerado inovador, no que diz respeito ao procedimento de coleta de leishmanias. Antes de minha participação no referido projeto, fui incentivado a pedir qualquer esclarecimento adicional que julgasse necessário, esclarecido por um participante do mesmo. Estou ciente que poderei recusar ou retirar meu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

Autorizo a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos e publicações científicas preservando, neste caso, a minha identidade. Autorizo, também o CPqAM/FIOCRUZ a estocar amostras biológicas para posteriores estudos.

Estou ciente que este documento é feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com a equipe.

Assinatura do paciente ou menor

data

Assinatura do responsável

data

Assinatura do médico responsável – CPqAM/FIOCRUZ

data

Endereço profissional: Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Rua: Arnaldo Marques, s/n Santo Amaro, Recife-PE. Fone: (81) 3413-1300.

APÊNDICE B - Tabela 6

Tabela 6 - Relação dos pacientes analisados, com suas características clínicas e epidemiológicas, incluindo os resultados dos exames laboratoriais (continua).

Nº do paciente	Sexo	Idade	Local de origem	Tipo de lesão	Local	Tempo de evolução	PCR		PD
							Biópsia	Swab	
1	m	35	Recife	Ulcerada	Mão	5 meses	+	+	+
2	f	63	Engenho Timbó/ Moreno	Ulcerada	Perna	15 dias	+	+	-
3	f	10	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
4	m	27	Engenho Buscaú/ Moreno	Ulcerada	Região escapular	2 meses	+	+	+
5	m	43	Engenho Massaranduba/ Moreno	Ulcerada	Pescoço	3 meses	+	+	+
6	f	34	Engenho Jardim/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
7	m	56	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	1 ano	+	+	+
8	f	35	Jardim São Paulo/ Recife	Ulcerada	Perna	1 mês	-	-	+
9	f	32	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	2 meses	+	+	-
10	f	27	Engenho Jardim/ Moreno	Ulcerada	Mão	3 meses	+	+	-
11	f	34	Bonança – Centro	Ulcerada	Perna	2 meses	-	-	+
12	m	47	Massaranduba/ Moreno	Ulcerada	Braço	2 meses	+	+	+
13	m	29	Brejo/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	-
14	m	35	Engenho Cumaru/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	+	-
15	f	32	Javunda/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	-	+
16	m	18	Engenho Jussara/ Moreno	Ulcerada	Perna	3 meses	+	-	-
17	f	28	Engenho Jardim/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
18	f	57	Engenho Jussara/ Moreno	Ulcerada	Pé	1 mês	+	+	+
19	f	66	Jussara/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	-	+	-
20	m	21	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
21	m	43	Engenho Jaboatãozinho/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	-	+

Tabela 6 - Relação dos pacientes analisados, com suas características clínicas e epidemiológicas, incluindo os resultados dos exames laboratoriais (continuação)

Nº do paciente	Sexo	Idade	Local de origem	Tipo de lesão	Local	Tempo de evolução	PCR		PD
							Biópsia	Swab	
22	m	22	Engenho Jardim/ Moreno	Ulcerada	Braço	20 dias	+	+	-
23	m	56	Jussara/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
24	m	38	Bonança – Centro	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
25	m	35	Massaranduba/ Moreno	Ulcerada	Braço	15 dias	+	+	+
26	m	73	Engenho Bonança/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	-	-	+
27	m	19	Engenho Jussara/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
28	m	52	Itaquaritinga	Crostosa	Todo o corpo	2 meses	+	+	+
29	m	49	Massaranduba/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
30	m	28	Carnijó/ Moreno	Ulcerada	Braço	15 dias	+	+	+
31	f	56	Jussara/ Moreno	Ulcerada	Braço	8 dias	+	+	+
32	m	44	Moreno – Centro	Ulcerada	Braço	1 mês	+	+	+
33	m	38	Recife	Ulcerada	Perna	2 meses	-	-	-
34	m	20	Moreno – Centro	Crostosa	Braço	2 meses	+	+	+
35	f	16	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Braço	1 mês	+	+	+
36	m	35	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	3 meses	+	+	+
37	m	75	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	2 meses	-	-	+
38	m	59	Engenho Jardim/ Moreno	Ulcerada	Perna	15 dias	+	+	+
39	m	44	Engenho Canzanza/ Moreno	Ulcerada	Cabeça	2 meses	+	+	+
40	m	60	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	15 dias	+	+	+
41	f	50	Moreno – Centro	Crostosa	Perna	1 ano	-	+	+
42	f	44	Engenho Canzanza/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	+	+
43	m	57	Macujé/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	+	+
44	m	NI	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	NI	+	+	-
45	m	23	Recife	Ulcerada	Perna	2 meses	+	+	+
46	m	55	Engenho Jardim/ Moreno	Crostosa	Perna	2 meses	+	+	-

Tabela 6 - Relação dos pacientes analisados, com suas características clínicas e epidemiológicas, incluindo os resultados dos exames laboratoriais (continuação)

Nº do paciente	Sexo	Idade	Local de origem	Tipo de lesão	Local	Tempo de evolução	PCR		PD
							Biópsia	Swab	
47	f	43	Jardim São Paulo/ Recife	Ulcerada	Perna	2 meses	-	-	-
48	f	13	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	3 meses	-	-	+
49	f	21	Sítio Mimoso/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	-	-	-
50	f	26	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	+	-
51	f	43	Jaboatãozinho/ Moreno	Ulcerada	Perna	15 dias	+	+	-
52	f	15	Jussara/ Moreno	Ulcerada com pápula	Braço	1 mês	+	+	-
53	f	48	Engenho Buscaú/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
54	m	7	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
55	f	12	Engenho Jardim/ Moreno	Ulcerada	Face	15 dias	+	+	+
56	f	66	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	-	+
57	m	22	Engenho Timbó/ Moreno	Ulcerada	Braço	1 mês	+	+	+
58	m	61	Engenho Pavão/ Moreno	Ulcerada	Mão	~ 2 anos	+	-	+
59	f	17	Engenho Oiteiro de Pedro/ Moreno	Ulcerada	Perna	15 dias	+	+	+
60	m	22	Recife	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
61	m	80	Aldeia/ Camaragibe	Ulcerada	Pé	2 meses	+	-	+
62	m	56	Recife	Ulcerada	Mão	2 meses	+	+	+
63	f	40	Olinda	Ulcerada	Perna	40 dias	-	-	-
64	m	68	Engenho Jussara/ Moreno	Ulcerada	Perna	4 meses	-	-	-
65	m	15	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	-	-
66	m	23	Engenho Camarão/ Moreno	Nodular	Perna	1 mês	+	+	+
67	f	68	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	15 dias	-	-	+
68	f	63	Engenho Canzanza/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
69	m	70	Amaraji – Centro	Ulcerada	Perna	3 meses	+	-	+

Tabela 6 - Relação dos pacientes analisados, com suas características clínicas e epidemiológicas, incluindo os resultados dos exames laboratoriais.

Nº do paciente	Sexo	Idade	Local de origem	Tipo de lesão	Local	Tempo de evolução	PCR		PD
							Biópsia	Swab	
70	m	32	Sítio Imbiribeira/ Bonito	Crostosa	Braço	4 meses	+	+	+
71	m	42	Engenho Jaboaãozinho/Moreno	Ulcerada	Pé	1 mês	+	+	+
72	f	49	Amaraji – Centro	Ulcerada	Pé	2 meses	+	-	-
73	f	71	Moreno – Centro	Ulcerada	Perna	2 meses	-	-	-
74	f	31	Riachão do Norte/ Amaraji	Ulcerada	Braço	1 mês	+	+	+
75	m	27	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Pé	15 dias	-	-	+
76	m	43	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Braço	2 meses	+	+	+
77	m	44	Jaboaãozinho/ Moreno	Ulcerada	Perna	15 dias	-	-	-
78	f	58	Jaboaãozinho/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	+
79	m	13	Jaboaãozinho/ Moreno	Ulcerada	Perna	1 mês	+	+	-
80	f	11	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Braço	3 meses	+	+	+
81	m	19	Jaboaãozinho/ Moreno	Crostosa	Orelha	3 meses	+	+	+
82	f	60	Chão de Alegria/ Camaragibe	Ulcerada	Perna	1 mês	-	-	-
83	m	21	Engenho Jaboaãozinho/ Moreno	Ulcerada	Tórax	3 meses	+	-	+
84	m	25	Itapoama – Cabo	Ulcerada	Perna	7 meses	-	-	-
85	m	53	Engenho Pinto/ Moreno	Ulcerada	Perna	2 meses	+	+	-
86	m	74	Engenho Pinto/ Moreno	Crostosa	Perna	2 meses	+	+	+
87	f	69	Engenho Jussara/ Moreno	Ulcerada	Perna	3 meses	-	-	+
88	f	59	Engenho Rinoceronte/ Moreno	Ulcerada	Perna	4 meses	-	-	+

Legenda: PCR - Reação em cadeia da polimerase. PD - Pesquisa direta. (m) - sexo masculino. (f) - sexo feminino. (+) - resultado positivo. (-) - resultado negativo.

APÊNDICE C - Artigo publicado

Hindawi Publishing Corporation
Case Reports in Dermatological Medicine
Volume 2012, Article ID 279517, 4 pages
doi:10.1155/2012/279517

*Case Report***Occupationally Acquired American Cutaneous Leishmaniasis**

Maria Edileuza Felinto de Brito,^{1,2} Maria Sandra Andrade,³ Éricka Lima de Almeida,¹
Ângela Cristina Rapela Medeiros,⁴ Roberto Pereira Werkhäuser,¹
Ana Isabele Freitas de Araújo,¹ Sinval Pinto Brandão-Filho,¹
Alzira Maria Paiva de Almeida,¹ and Eduardo Henrique Gomes Rodrigues¹

¹ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Campus da Universidade Federal de Pernambuco s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

² Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

³ Departamentos de Enfermagem, Universidade de Pernambuco, Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro, 50.100-130 Recife, PE, Brazil

⁴ Departamentos de Dermatologia, Universidade de Pernambuco, Rua Arnóbio Marques 310, Santo Amaro, 50.100-130 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to Maria Edileuza Felinto de Brito, britomef@cpqam.fiocruz.br

Received 2 October 2012; Accepted 6 November 2012

Academic Editors: T. Erdem, N. Oiso, and T. Salopek

Copyright © 2012 Maria Edileuza Felinto de Brito et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

We report two occupationally acquired cases of American cutaneous leishmaniasis (ACL): one accidental laboratory autoinoculation by contaminated needlestick while handling an ACL lesion sample, and one acquired during field studies on bird biology. Polymerase chain reaction (PCR) assays of patient lesions were positive for *Leishmania*, subgenus *Viannia*. One isolate was obtained by culture (from patient 2 biopsy samples) and characterized as *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* through an indirect immunofluorescence assay (IFA) with species-specific monoclonal antibodies (mAbs) and by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE). Patients were successfully treated with N-methyl-glucamine. These two cases highlight the potential risks of laboratory and field work and the need to comply with strict biosafety procedures in daily routines. The swab collection method, coupled with PCR detection, has greatly improved ACL laboratory diagnosis.

1. Introduction

Health professionals such as physicians, nurses, and laboratory workers and researchers and students in the biological sciences are at risk of a number of occupational infections [1]. Accidents involving contaminated “sharps” are, in general, extremely dangerous due to the high likelihood of infectious agent transmission. Exposure to blood-borne pathogens represents an especially serious risk. Needlestick and sharps contamination accidents involving at least 20 different pathogens, most commonly hepatitis B and C or human immunodeficiency virus (HIV), have been reported [1]. Some occupational accidents with *Leishmania* spp. related to percutaneous injuries, contaminated

animal/culture handling, or lesion sample collection have also been reported [2].

ACL diagnosis is based on clinical, epidemiological, and laboratorial criteria. However, clinical diagnosis is often difficult due to the varied presentation of the disease, and the epidemiological criteria may go unnoticed because clinicians are not aware of the existence or nature of the disease [3, 4].

Laboratory diagnosis includes the direct identification of amastigotes through direct examinations of stained smears from imprints or histological sections, isolation of promastigotes by culture, and immune-based methods (e.g., ELISA, Western blot, indirect immunofluorescence (IFAT), and delayed hypersensitivity or Montenegro intradermoreaction (MIDR)), [5, 6].



FIGURE 1: (A1): papule on 2nd left finger. (A2)–(A5): four months evolution prior to treatment. (A6)–(A10): lesion healing. (B1): reoccurrence, new lesion detection thirty days post treatment. (B2): healed lesion. (C1): lesion on 3rd right finger. (C2): healed lesion.

Laboratory procedures may be hindered by the scarcity of amastigotes in the wounds, especially in late stages of the disease and secondary infections, or by the low sensitivity and cross reactivity of serological tests. Furthermore, the MIDR test does not distinguish between current and past infections, and it is usually negative in patients with the diffuse form of the disease or who are immunosuppressed [5].

Polymerase-chain-reaction (PCR-) based methods provide high sensitivity and specificity, especially when performed in biopsy samples [7, 8]. However, the collection of biopsy material is painful, requiring anesthesia, and it can only be performed by physicians in nosocomial environment, which may increase the risk of iatrogenic bacterial infections. Sample collection using a cotton swab is noninvasive, simple, rapid, and easy, does not require hospitalization, and is associated with low infection risk and patient discomfort [9].

Here, we report a successful combination of non-invasive sample collection using the “swab” method and PCR for the diagnosis of ACL in two occupationally acquired cases.

2. Case Reports

2.1. Case 1. Case 1 is a 60-year-old female residing in Recife, PE, Brazil and who has worked for more than 20 years in an ACL research laboratory.

Five weeks after a needlestick accidental auto-inoculation while processing a sample from a patient ACL lesion, she developed a papule at the point of inoculation on the 2nd finger of the left hand. The papule evolved into an ulcer with high edges, measuring 2.0×3.0 mm, with production of exudates (Figure 1, (A1)–(A5)), adjacent lymphangitis, and left-axillary ganglion swelling.

X-rays and magnetic resonance imaging revealed no bone degradation (data not shown). Exudates culture revealed *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus faecalis*. Tigecycline was administered but did not promote wound healing. A lesion sample was collected using sterilized swab, and PCR testing was positive for *Leishmania*, subgenus *Viannia* [10]. Two treatment cycles with N-methyl-glucamine ($15 \text{ mg Sb}^{+V}/\text{kg}/\text{day}$) for twenty days were necessary for complete healing. The lesion began to heal at day 15 and completed by day 18 (Figure 1, (A6)–(A10)). However, one month later, a new lesion measuring 1.0×1.0 mm presented in the right forearm (Figure 1, (B1)). Swab collection and PCR ACL detection again returned a positive result for *Leishmania*, subgenus *Viannia* [10]. Complete remission of the lesion and clinical resolution were achieved at day 20 of the second treatment cycle (Figure 1, (B2)). During the treatments, the patient reported symptoms that may have been related to side effects of the medication, such as asthenia and arthralgia; nevertheless, the treatments were concluded successfully.

2.2. *Case 2.* A 35-year-old male doctoral student noticed the emergence of an ulcerated lesion with high edges, measuring 2.0×1.5 mm (Figure 1, (C1)) with exudates on the 3rd finger of the right hand, suggestive of ACL. The lesion was first noted two months after fieldwork capturing birds in the forests in Paranati, Mato Grosso, Brazil.

Routine clinical and laboratory examinations comprising immunological and parasitological tests were carried out in the SRL (Leishmaniasis Reference Laboratory, FIOCRUZ-PE, Recife, PE, Brazil), and lesion samples were collected both by biopsy and the swab method. Optical microscopy showed amastigote parasites on Giemsa-stained smears; MIDR was positive within 48 h, and biopsy sample culturing in NNN/Schneider media for 5 days at 26°C enabled parasite isolation. The isolate was characterized as *Leishmania (Viannia) naiffi* through IFA with species-specific monoclonal antibodies (mAbs) [11] and by multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) [12]. PCR reactions from biopsy and swab samples were both positive for *Leishmania*, subgenus *Viannia* [10].

The patient was treated with N-methyl-glucamine ($15 \text{ mg Sb}^{+5}/\text{kg}/\text{day}$) for 20 days. Injury healing began at day 11 and completed after the completion of treatment (Figure 1, (C2)).

The patient had some complaints of asthenia and arthralgia during the treatment that were related to side effects of the medication.

2.3. *Ethical Considerations.* The present study was approved by the Research Ethics Committee of FIOCRUZ-PE, Recife, PE, Brazil (CEP-FIOCRUZ/PE, 41/2008).

3. Discussion

“Occupational disease” defines a change in a worker’s health caused by chemical, environmental, biological, psychological, or other work-related factors. Cutaneous leishmaniasis and mucocutaneous leishmaniasis are listed as occupational diseases by the Brazilian Health Ministry [13]. Agricultural and forestry work in endemic areas and other specific situations, such as deforestation work for building roads, fieldwork for research biologists and military training are examples of situations with a risk of occupational exposure to *Leishmania braziliensis* [14]. Laboratory or nosocomial environment work-related accidents with *Leishmania* spp. involve percutaneous accidental contamination while handling fluids, culture, and/or laboratory animals [2].

In this paper, we report two different occupationally acquired ACL cases: one accidental laboratory contamination while handling an infected sample and one infection acquired during field studies unrelated to ACL.

Linking ACL to occupational accidents may be impaired by a lack of epidemiological ground knowledge, its similarity to other dermatological injuries, or coinfection with other pathogens [15]. Association with fungi and bacteria is common in ACL lesions and constitutes a complicating factor for the clinical diagnosis and treatment of leishmaniasis.

For example, strains of *A. baumannii* and *E. faecalis* were identified by culture in the ACL lesion in Case 1.

However, they were excluded as causative agents because tigecycline administration failed to heal the lesion. Response to the antimonial therapy is an auxiliary ACL diagnosis criterion, and the two cases were successfully healed in this way.

Although several *Leishmania* species are in circulation in Brazil, *L. (V.) braziliensis* is the most medically important species; it is distributed nationwide and causes a more severe form of the disease than do the other circulating species [3, 15]. *L. (V.) naiffi* is alleged to produce a mild infection in humans, and its spread is restricted to the Pará and Amazonas states [16].

Early and accurate ACL diagnosis is essential for rapid and effective treatment. PCR-based procedures can distinguish *Leishmania* species and subspecies in samples from different sources and have proved useful for confirming the persistence of the parasite in scars [17–21].

A persistence of the parasite in spite of lesion healing occurred in Case 1, and the patient developed a new lesion one month after completion of the first antimonial treatment cycle. Complete clinical cure was achieved at end of a second treatment cycle.

In our work, the combination of the swab sample collection technique and PCR proved to be an efficient means for ACL diagnosis in the two patients. Implementation of the swab method for routine sample collection is feasible and has many advantages: it can be performed by any health-care, nonphysician professional; it does not require anesthesia; the procedure can be carried out at the patient’s home or in an outpatient setting, without the discomfort of patient displacement and hospitalization.

The swab technique allows collection from the full extent of the lesion. Unlike invasive methods such as tissue biopsy, swab collection minimizes the risk of iatrogenic infections that may compromise diagnosis and patient recovery [8]. Furthermore, because it does not use any “sharps” devices, this method is safer for the professionals involved on biological material collection.

In conclusion, this paper illustrates the need for individual protective procedures by health care professionals dealing with ACL patients. The swab method for wound sample collection would reduce the risk of accidental infection during the collecting and handling of diagnostic samples. The importance of the proper use of personal protective equipment (PPE) by exposed workers should be duly emphasized and its use should be required, both in clinical settings and in field or laboratory activities.

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgment

The author acknowledges Gilvan Mariano for his help with the illustration.

References

- [1] C. H. Collins and D. A. Kennedy, "Microbiological hazards of occupational needlestick and "sharps" injuries," *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 62, no. 5, pp. 385–402, 1987.
- [2] B. L. Herwaldt, "Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 14, no. 4, pp. 659–688, 2001.
- [3] G. Grimaldi and R. B. Tesh, "Leishmaniases of the new world: current concepts and implications for future research," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 6, no. 3, pp. 230–250, 1993.
- [4] K. Kar, "Serodiagnosis of leishmaniasis," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 21, no. 2, pp. 123–152, 1995.
- [5] J. J. Shaw and R. Lainson, "Leishmaniasis in Brazil—X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 69, no. 3, pp. 323–335, 1975.
- [6] M. E. F. Brito, M. G. Mendonça, Y. M. Gomes, M. L. Jardim, and F. G. C. Abath, "Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis," *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, vol. 7, no. 2, pp. 318–321, 2000.
- [7] S. F. Brenière, J. Telleria, M. E. Bosseno et al., "Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes," *Acta Tropica*, vol. 73, no. 3, pp. 283–293, 1999.
- [8] E. H. Gomes Rodrigues, M. E. Felinto De Brito, M. G. Mendonça et al., "Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 40, no. 10, pp. 3572–3576, 2002.
- [9] T. Mimori, T. Matsumoto, M. H. Calvopina et al., "Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World," *Acta Tropica*, vol. 81, no. 3, pp. 197–202, 2002.
- [10] M. H. L. De Bruijn and D. C. Barker, "Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA," *Acta Tropica*, vol. 52, no. 1, pp. 45–58, 1992.
- [11] J. J. Shaw, E. A. Y. Ishikawa, and R. Lainson, "A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 83, no. 6, pp. 783–784, 1989.
- [12] E. Cupolillo, G. Grimaldi Jr., and H. Momen, "Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci," *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, vol. 89, no. 1, pp. 17–23, 1995.
- [13] BRASIL, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2nd ed. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2007.
- [14] J. Shaw, "The leishmaniases—survival and expansion in a changing world. A mini-review," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 102, no. 5, pp. 541–546, 2007.
- [15] M. E. F. Brito, M. S. Andrade, M. G. Mendonça et al., "Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil," *Tropical Medicine and International Health*, vol. 14, no. 10, pp. 1278–1286, 2009.
- [16] R. Lainson, J. J. Shaw, F. T. Silveira, R. R. Braga, and E. A. Ishikawa, "Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* Lainson and Shaw, 1989," *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, vol. 65, no. 5–6, pp. 282–284, 1990.
- [17] R. Aragort de Rossell, R. De Jesus de Duran, O. Rossell, and A. M. Rodriguez, "Is leishmaniasis ever cured?" *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 86, no. 3, pp. 251–253, 1992.
- [18] T. Aebischer, "Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites?" *Parasitology Today*, vol. 10, no. 1, pp. 25–28, 1994.
- [19] J. L. Ramirez and P. Guevara, "Persistent infections by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 92, no. 3, pp. 333–338, 1997.
- [20] A. Schubach, M. C. A. Marzochi, T. Cuzzi-Maya et al., "Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure," *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 58, no. 6, pp. 824–827, 1998.
- [21] M. G. Mendonça, A. E. F. De Brito, E. H. G. Rodrigues, V. Bandeira, M. L. Jardim, and F. G. C. Abath, "Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure?" *Journal of Infectious Diseases*, vol. 189, no. 6, pp. 1018–1023, 2004.

APÊNDICE D - Artigo para publicação

Swab as a new tool for samples collection for American cutaneous leishmaniasis diagnosis: application in endemic areas

Ana Isabele Freitas de Araujo,¹ Maria Edileuza Felinto de Brito,^{1,2} Juliana Bezerra Medeiros Viana,¹ Joanna Lucia de Almeida Alexandre,¹ Roberto Pereira Werkhäuser,¹ Ericka Lima de Almeida,¹ Ângela Cristina Rapela Medeiros,³ Alzira Maria Paiva Cavalcanti,¹ Sinval Pinto Brandão-Filho,¹ Eduardo Henrique Gomes Rodrigues¹

¹Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife - PE, Brazil.

²Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal Pernambuco, Recife - PE, Brazil.

³Departamento de Dermatologia, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Recife - PE, Brazil.

Correspondence: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, BSC, MPH, DSc, Researcher at Immunology Department of Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, 50670-420, Recife – PE, Brazil, (eduardohrodrigues@gmail.com).

Abstract

Background American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an important infectious disease and, although widely distributed in tropical and subtropical areas mostly in sub-developed countries, it remains a neglected disease. The correct identification of the parasites is highly important for the patient's treatment which is extremely slow and toxic. However the current methods for samples collection for diagnosis are very invasive and troublesome both for the health staff and patients. This study aimed to standardize and apply a swab based collection method for ACL diagnosis by polymerase chain reaction (PCR). **Methods** Swabs and biopsy samples were obtained in parallel from 88 patients from endemic areas of Pernambuco State,

Brazil and were analyzed by PCR targeting kDNA minicircle of *Leishmania (Viannia)* spp. Dermal scrapings were also taken and used for microscopic examination of parasites amastigotes. **Results** A 86.36% concordance and 13.64% discordance was observed between the results from the two sample collection procedures. The direct analysis revealed positive in 70.45% of the patients. **Conclusion** The swab collection method revealed useful for ACL diagnosis and should be recommended for the routine of samples collection instead of biopsy.

Key-words: American cutaneous leishmaniasis. Swab. Diagnosis. PCR.

Introduction

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an infectious disease caused by several *Leishmania* species transmitted by the bite of infected insects of the genus *Lutzomyia*. The spectrum of the clinical manifestations depends on the parasite species involved, the infectious dose, the site of inoculation and the host nutritional and immune status [1-3]. Humans, exhibit a wide spectrum, from mild to severe, clinical manifestations [4]; usually occurring the development of single or multiple, dry and crusted or exudative lesions, sometimes unnoticed. The initial lesion may resolve spontaneously or progress to a more severe form of the disease, including treatment resistance.

ACL is distributed worldwide in tropical and subtropical areas mostly in sub-developed countries. It is recorded throughout Brazil where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the species most commonly associated with the disease. *L. (Leishmania) amazonensis* has high prevalence in the North region but it is also reported in the Northeast, Southeast and Midwest regions [5-8]. From 2009-2010 a total of 45,574 autochthonous cases of ACL were reported in Brazil, of which 980 in Pernambuco State [9].

The routine diagnosis of ACL based on clinical and epidemiological evidence, however, the identification of the parasite is crucial for the correct treatment [10, 11,12].

The “gold standard” for *Leishmania* identification is the direct smear. Other classical methods are the parasite culture and immunological techniques as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence (IIF) and western blot [13; 14].

The polymerase chain reaction (PCR) based procedures are highly sensitive and specific and allows the parasites detection directly from samples containing only a few parasites [13]. Furthermore, it avoids cross-reaction with other Trypanosomatidae as may occur in the immunological techniques.

Usually the patient’s samples for diagnosis are collected by biopsy. However, this procedure is painful, requiring anesthesia, and it can only be performed by physicians in nosocomial environment. Furthermore, this invasive procedure lead to the inflammation and even reactivation of the lesions and secondary bacterial infection. The aim of this study was to compare the performance of swab and biopsy collection samples for ACL diagnosis by PCR.

Material and Methods

Casuistic

Outpatients assisted at the Hospital Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco - UPE, Recife, PE, Brazil during the period of March 2011 to June 2012. The patient’s inclusion criteria for the study were: epidemiological or clinical evidence for ACL and positive results in direct smear or PCR. The project was approved by the Ethics Committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) (n° 38/2008), and the individuals involved signed an informed consent form.

Sample collection

Samples were collected under sterile conditions and prior treatment. From each patient parallel samples from the same active lesion were collected by scraping, swab and biopsy.

Exudates from the lesion surfaces were thoroughly collected moving the swab in “zig-zag” throughout the lesion surface (Figure 1). In case of dry lesions the swabs were previously soaked into sterile normal (0.8%) saline. Biopsy samples were collected by skin-punch of 4-6 mm diam. specimens at the border of the lesion under local anesthesia (3% prilocaine chloridrate). Samples were stored in 1.5 ml tubes at -4°C (swabs) and -70°C (biopsy) for PCR. The scrapings were performed with disposable sterile scalpels Surgical blade stainless no. 10 (Feather Safety Razor CO., LTD) and the samples obtained were spread on microscope slides, fixed with methanol and stained with Giemsa for direct microscopic examination.

Figure 1. Cutaneous exsudates collection throught swab. Abbreviations: (A) Indicates the collection at the edge of the lesion and (B) in the center of the lesion.



DNA extraction and PCR analysis

Genomic DNA was extracted from skin biopsies and swabs using a commercial kit (QIamp[®] DNA Mini Kit - Qiagen, Valencia, USA) following the manufacturer's instructions. The primers LEIB1 (5'-GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG-3') and LEIB2 (5'-CTA ATT GTG CAC GGG GAG G-3') directed to *Leishmania (Viannia)* spp. kDNA minicircles [15, 16] were used in the PCR reactions. PCR mixtures were prepared in a 25 μL volume containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mg of gelatin per ml, 1.5 mM MgCl, 0.2 mM of deoxynucleoside triphosphate, 25 pmol of each primer, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase

(Amersham Pharmacia Biotech). Amplification was carried out in an Eppendorf® thermocycler, Master Cycler gradient model following 35 cycles.

Negative and positive controls were included each PCR run to detect false-positive results due to contamination or variations in sensitivity. Negative control was the PCR mix without DNA and positive control was 1 ng / μ L and 10 pg / μ L DNA from the reference strain IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903 (*Leishmania (Viannia) braziliensis*). The amplified fragments (10 μ L) were separated by electrophoresis at 6 V/cm in 1% agarose gels in 1X TAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA). Ethidium bromide-stained gels were visualized and photographed under UV and digitized using a Kodak® documentation system, Model 100 Gel Image System Logic.

Results

A total of 88 patients: 52 males (59.1%) and 36 females (40.9%) were selected for the study. Most of them (80.7%) were from Moreno and 19.3% from Amaraji and neighborhood, located in the “Zona da Mata region”, coastal area of Pernambuco State and endemic area for *L. (V.) braziliensis*. Altogether, 176 samples (88 swabs and 88 biopsies) were analyzed by PCR as above described.

A total of 68 biopsies (77.27 %) was positive in PCR whereas 20 were negative. Comparing to the swab samples, 60 were positive (68.18 %) and 28 negative. The direct analysis, considering to be the gold standard, revealed positive in 70.45% of the 88 patients.

The comparison of the PCR results showed a compatibility of up to 86% and 13.64% of discordance (Table 1). These data were statistically significant (p value > 0.001). The value obtained from Kappa analysis between the PCR results from swab and biopsy samples (0.66) was substantial. Figures 2 and 3 show the 750 bp specific band for *Leishmania (Viannia) braziliensis* kDNA minicircle from representative swab and biopsy samples.

Discussion

Usually biological samples for ACL diagnosis are collected by scraping or biopsy from the edges of the active lesions. Biopsy, although the mostly used, is a microsurgical procedure, extremely invasive requiring special pre and pos-care. Moreover, secondary infections, especially the bacteriological infections can impair or mislead the parasite diagnosis.

PCR-based diagnosis procedures from samples collected by varied methods become increasingly popular due to the high sensitivity, speed and efficiency compared to other methods, and offer new possibilities and alternatives for clinical and epidemiological studies of leishmaniasis [13, 19-21].

The use of sterile toothpicks as reported for samples collection from patients from Bolivia [14] entails risks of injury of the active lesions. Mimori et al [20] demonstrated for the first time the usefulness of cotton swab collection samples for ACL diagnosis. However, sterile scalpel blades were used to remove cutaneous exudates prior to the swabbing. The routine collection of skin exudates is important mainly in special cases of facial or other sensitive location lesion sites and the biopsy collection is inadvisable. Additionally the swab method for routine sample collection has other advantages: it can be performed by any health-care, non-physician professional; it does not require anesthesia; and the procedure can be carried out at the patient's home or in an outpatient setting, without the discomfort of patient displacement and hospitalization [21].

The development of a noninvasive collection method coupled with a high sensitive and specific diagnosis technique is of the utmost importance. In a previous work [21] we showed the usefulness of cotton swabs collection coupled with PCR for ACL diagnosis.

In the present study, parallel samples from 88 patients were collected by biopsy and swab and analyzed by PCR. The direct analysis, the gold standard for ACL, diagnosis revealed positive in 70.45% of the 88 patients.

The PCR results from skin biopsy samples and swab from exudates were compared. The value obtained from Kappa analysis was 0.66 which, according to Landis and Koch [22], is considered substantial. This index shows the significant effectiveness of the swab collection technique compared to biopsy. Actually, among the positive and negative results, 86.36% were compatible demonstrating the high efficiency of the swab collection technique. In 13.64% of the cases the results were discordant: 10 biopsy samples PCR positives were negative from the swab samples, whereas two opposite results were also obtained (biopsy negative/swab positive). This divergence (higher biopsy positive results) could be attributed to some shortcomings during swab exudates collection or by the parasites scarcity on the exudates, for the parasites amount is inversely proportional to the infection time length [23; 24].

Concerning the two biopsy negative and swab positive patients one can speculate that in spite of more tissue is obtained by biopsy it is not a rule to obtain a higher number of parasites, for they are not evenly spread over the lesion area.

Actually, the evenly parasite presence throughout the lesion area is unlikely. Hence, parasites absence in small biopsy collected fragments and false negative results must be admitted.

On the other hand, the swab technique allows exudates collection throughout the lesion, even from the lesion center from where the removal of fragments is not usually technically encouraged in spite of the known high parasites concentration.

In conclusion, the results from the present study proved that the collection of skin lesion exudates by swab for ACL diagnosis is technically feasible and provided better results

than biopsy. The implementation of this simple and safe procedure coupled with PCR instead of biopsy should be encouraged. These results may contribute for ACL diagnosis and the control success in endemic areas.

Notes

Acknowledgements

We thank the Service of Dermatology of the University Hospital Oswaldo Cruz, University of Pernambuco – UPE, Recife, Pernambuco, Brazil, for the use of its facilities and by the biological samples collection. We are especially obliged to MSc Julio Claudio da Silva for directing patients from endemic areas to the hospital.

Financial support

This work was supported by a grant from the CPqAM/FIOCRUZ and CNPq (PAPES V – 403645/2008-5).

Potential conflicts of interest

The authors have no conflict of interest concerning the work reported in this article.

References

1. Ghosn SH, Kurban AK. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, editors. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. Leishmaniasis and other protozoan infections. 7th ed. Vol 11. New York: McGraw Hill Inc, **2008**: 2001-9.

2. Beenal KR, Ramesh V, Mukherjee A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. *J Cutan Pathol* **2003**; 30:616-20.
3. Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different processes and status protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* **2003**; 33:1373-83.
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2007, 182p.
5. Bittencourt AA, Barral AR, De Jesus AR, Almeida RP, Grimaldi-Júnior G. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **1989**; 84:585–586.
6. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Pub* **1994**; 10:359–375.
7. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive W, 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* **1999**; 72:251–258.
8. Silveira TGV, Teodoro U, Arraes SMAA, 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* **1990**; 85:475–476.

9. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Available at <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>
Accessed 17 November 2011.
10. Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Sharp SJ, et al. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms response to treatment, and parasite isolation rate. *Clin Infec Dis* **1997**; 25:302-310.
11. Costa JML, Saldanha ACR, Nascimento D, et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. *Gaz Méd Bahia* **2009**; 79:70-83.
12. Escobar MA, Martinez F, Scott Smith D, Palma GI. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. *Trop Doct* **1992**; 22:69-78.
13. Rodrigues EHG, Brito, MEF, Mendonça, MG, et al. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. *J Clin Microb* **2002**; 3572-3576.
14. Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2007**; 4:368-71.
15. De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* **1992**; 52:45-58.

16. Eresh S, McCallum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* **1994**; 109:423-33.
17. De Bruijn MHL, et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. *Trop Med Parasitol* **1993**; 44: 201-207.
18. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* **1990**; 71: 267-275.
19. Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. *An Trop Med Parasitol* **1995**; 89: 95-100.
20. Mimori T, Matsumoto T, Calvopiña MH. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop* **2002**; 81:197-202.
21. Brito MEF, Andrade MS, Almeida EL, Medeiros ACR, Werkhauser RP, Araújo AIF, Brandão-Filho SP, Almeida AMP, Rodrigues EHG. Occupationally Acquired American Cutaneous Leishmaniasis. *Case Rep Dermatol Med* **2012**; 1-4.
22. Landis J R, Koch G G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**; 33:159–174.
23. Rodriguez N, et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microb* **1994**; 9:2246-52.
24. Weigle KA, et al. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microb* **2002**, 40:601–606.

Figure Legends

Figure 2. PCR products of swab samples amplified using specific primers for *Leishmania (Viannia)* spp. kDNA minicircles in ethidium bromide stained 1% agarose gel electrophoresis. Abbreviations: PM 100bp DNA Ladder, Invitrogen: 2072, 1500, 600 and 100 bp; C+: Positive control (1ng/μL); C-: negative control; 1, 5, 9, 11 and 12: negative samples; 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 and 13: positive samples. The amplified 750bp fragment is indicated by the arrow.

Figure 3. PCR products of biopsy and swab samples amplified using specific primers for *Leishmania (Viannia)* spp. kDNA minicircles in ethidium bromide stained 1% agarose gel electrophoresis. Abbreviations: PM 100bp DNA Ladder, Invitrogen: 2072, 1500, 600 and 100 bp; C++: Positive control (1ng/μL); C+: Positive control (10pg/μL). C-: negative control; 1, 2, 3, 4, 6: positive biopsy samples and 8, 9, 10, 12, 13, 15: positive swab samples. The amplified 750bp fragment is indicated by the arrow.