

FIOCRUZ

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

LILIANE DE FÁTIMA ANTONIO OLIVEIRA

A INFLUÊNCIA DE INFECÇÃO SECUNDÁRIA E DE OUTROS FATORES
NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES ULCERADAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA
E ESPOROTRICOSE

Rio de Janeiro

2017

O. LFA TESE DO INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS

DOUTORADO

DPCDI -2017

LILIANE DE FÁTIMA ANTONIO OLIVEIRA

**A INFLUÊNCIA DE INFEÇÃO SECUNDÁRIA E DE OUTROS FATORES
NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES ULCERADAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA E
ESPOROTRICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.
Orientadores: Prof. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel e Prof. Dr. Marcelo Rosandiski Lyra

Rio de Janeiro

2017

Oliveira, Liliane de Fátima Antonio .

A INFLUÊNCIA DE INFECÇÃO SECUNDÁRIA E DE OUTROS FATORES NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES ULCERADAS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA E ESPOROTRICOSE / Liliane de Fátima Antonio Oliveira. - Rio de Janeiro, 2017.

121 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2017.

Orientadora: Maria Inês Fernandes Pimentel.

Co-orientador: Marcelo Rosandiski Lyra.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Bactérias. 2. Cicatrização. 3. Esporotricose. 4. Fungos. 5. Leishmaniose cutânea. I. Título.

LILIANE DE FÁTIMA ANTONIO OLIVEIRA

**A INFLUÊNCIA DE INFECCÃO SECUNDÁRIA E DE OUTROS FATORES
NA CICATRIZAÇÃO DE LESÕES ULCERADAS DE LEISHMANIOSE
CUTÂNEA E ESPOROTRICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadores: Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel

Dr. Marcelo Rosandiski Lyra

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Paes (Presidente)

Doutor em Biologia Celular e Molecular - INI/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira

Doutora em Epidemiologia em Saúde Pública - INI/FIOCRUZ

Prof. Dr. Antonio Macedo D'Acri

Doutor em Dermatologia - UNIRIO

Prof^a. Dr^a. Érica de Camargo Ferreira e Vasconcellos

Doutora em Ciências da Saúde - FTESM

Prof. Dr. Sandro Javier Bedoya-Pacheco

Doutor em Saúde Coletiva – ENSP/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Aline Fagundes (Suplente)

Doutora em Vigilância Sanitária - INI/FIOCRUZ

A Deus, por cuidar de mim, me dar inspiração, força e sabedoria.

Aos meus pais, por toda dedicação, apoio e compreensão na minha formação e em todos os momentos de minha vida.

Ao meu marido, pelo incentivo e pelo apoio no dia a dia. Aos amigos e familiares, que comigo vivenciaram mais um momento de vitória em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Toda e qualquer falha deste trabalho deve ser creditada exclusivamente à autora do mesmo. Todos os méritos, porém, têm que ser divididos com todos aqueles que participaram e fizeram o melhor de si por sua realização, de todas as formas possíveis. A todos, meus agradecimentos...

Aos meus orientadores e amigos, Dr^a Maria Inês Fernandes Pimentel e Dr Marcelo Rosandiski Lyra, por me ajudarem a realizar este trabalho e principalmente por todo o ensinamento, atenção, amizade, carinho, dedicação, enfim, por tudo.

Ao Dr. Armando Schubach, pelos ensinamentos, disponibilidade, atenção e amizade.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da FIOCRUZ.

Ao Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do INI/Fiocruz, pela acolhida, respeito, ajuda e incentivo à realização deste trabalho.

A Rodrigo de Almeida Paes e aos amigos do Laboratório de Micologia do INI/Fiocruz, que me receberam tão bem e me auxiliaram em todas as questões relativas aos fungos, obrigada por toda a ajuda.

A Maria Cristina da Silva Lourenço e ao pessoal do Laboratório de Bacteriologia e Bioensaios do INI/Fiocruz, pela paciência, incentivo e toda a ajuda em relação à infecção bacteriana secundária das lesões de leishmaniose e esporotricose, minha profunda gratidão.

A Priscila de Sá pela disponibilidade, carinho e atenção.

À professora Raquel Vasconcellos, pela ajuda em estatística e pela amizade.

À equipe e amigos do “Ambulatório”, pelo apoio e incentivo.

Aos professores com quem tive oportunidade de aprender, durante os créditos, uma lição de ciência.

A todos os colegas da turma de 2013 da Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, pela amizade e maravilhosa convivência.

Aos amigos Luciana e Eduardo pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos que me apoiaram e me incentivaram a realizar meus sonhos profissionais em minha vida, especialmente meus pais, Cleusa e José Antonio, que se doaram para que esses sonhos se realizassem.

A minha linda família, meus tios, primos e avós que tanto rezaram por mim para me manter forte em todos os momentos.

Ao meu marido Paulo Henrique, por todo amor e carinho diários que me mantêm firme nos projetos de nossa vida.

E a todos aqueles que, mesmo não tendo sido citados, com certeza nunca serão esquecidos....

Antonio-Oliveira, L. F. **A influência de infecção secundária e outros fatores na cicatrização de lesões ulceradas de leishmaniose cutânea e de esporotricose.** Rio de Janeiro, 2016.110 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz

RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) e a esporotricose frequentemente se apresentam com lesões ulceradas. O rompimento da barreira cutânea predispõe à infecção secundária. Em tese, a presença de bactérias e/ou fungos nas lesões ulceradas poderia dificultar o processo de cicatrização. Ambas são doenças endêmicas no estado do Rio de Janeiro e fazem parte do diagnóstico diferencial das lesões cutâneas ulceradas. Objetivamos verificar a presença de bactérias e/ou fungos nas úlceras cutâneas de leishmaniose e esporotricose, e averiguar se isto interferiu na epitelização e cicatrização das lesões ulceradas e no tempo necessário para tais desfechos. Em um estudo de coorte prospectivo, foram incluídos 25 pacientes com LC e 64 pacientes com esporotricose, com lesões ulceradas, atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, entre outubro de 2013 e fevereiro de 2016. Na fase de investigação diagnóstica, as úlceras cutâneas foram biopsiadas para coleta de fragmentos para exame bacteriológico (bacterioscopia e cultura de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas), cultura para *Leishmania* spp e cultura para fungos, cada qual em meios apropriados. Verificou-se a resposta terapêutica (epitelização e cicatrização) e o tempo em dias necessário para alcançar estes desfechos, comparando os pacientes que apresentaram ou não bactérias e/ou fungos nas lesões ulceradas por ocasião do diagnóstico. Cerca de 40% das lesões de pacientes com LC apresentaram infecção secundária por um ou mais de 5 diferentes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida parapsilosis*, *Enterococcus faecalis*, e *Streptococcus pyogenes*. Nos casos de esporotricose, encontramos 9,4% das lesões com coinfeção por *Staphylococcus aureus* e/ou *Enterobacter cloacae*. Conseguimos isolar *Sporothrix* spp em meio NNN + Schneider em 98% dos casos de esporotricose. A ocorrência de infecção secundária foi estatisticamente superior nos casos de LC do que na esporotricose, no entanto, não influenciou o tempo de epitelização ou de cicatrização total das lesões destas enfermidades. Na LC a localização da lesão influenciou o tempo de epitelização, e o diâmetro da lesão e o tratamento utilizado influenciaram a cicatrização total das lesões. Nos casos de esporotricose, a idade e a visualização de fungos no exame histopatológico influenciaram no tempo de epitelização da doença, e o tempo de evolução da doença e a visualização de fungos no exame histopatológico ajustados por sexo influenciaram no tempo de cicatrização total. O sexo, ocorrência de infecção secundária, localização, tipo de cicatriz, tempo de evolução e número das lesões foram significativamente diferentes entre LC e esporotricose e podem auxiliar no diagnóstico diferencial entre estas duas doenças.

Palavras-chave: Bactérias; Cicatrização; Esporotricose; Fungos; Leishmaniose cutânea.

Antonio-Oliveira, L. F. **The influence of second infection and others factors in scaring lesions of cutaneous leishmaniasis and sporotrichosis.** Rio de Janeiro, 2016.110 f. Thesis [Doctorate degree in Clinical Research in Infectious Diseases] – Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - Oswaldo Cruz Foundation

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) and sporotrichosis often present with ulcerated lesions. The rupture of the skin barrier predisposes to secondary infection. In thesis, the presence of bacteria and / or fungi in the ulcerated lesions could hinder the healing process. Both are endemic diseases in the state of Rio de Janeiro and they are part of the differential diagnosis of the ulcerated skin lesions. We aimed to verify the presence of bacteria and / or fungi in cutaneous ulcers of leishmaniasis and sporotrichosis, and also to investigate if it interfered in the epithelialization and in the total healing of the ulcerated lesions, as well as in the time necessary for such outcomes. A prospective cohort study included 25 patients with CL and 64 patients with ulcerated sporotrichosis treated at the Laboratory of Clinical Research and Surveillance in Leishmaniases of the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, between October, 2013 and February, 2016. Cutaneous ulcers were submitted to biopsy as part of the procedures during diagnostic investigation phase, and fragments of the lesions were sent to bacteriological exams (bacterioscopy and culture for aerobic and facultative anaerobic bacteria), culture for *Leishmania* spp and culture for fungi, each one in appropriate media. The therapeutic response (epithelialization and total healing) and the time in days required to reach these outcomes were analysed in order to compare patients who presented or not bacteria and / or fungi in the ulcerated lesions at the time of diagnosis. About 40% of the lesions of patients with CL presented secondary infection by one or more of 5 different microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida parapsilosis*, *Enterococcus faecalis*, and *Streptococcus pyogenes*. In sporotrichosis cases, we found 9.4% of the lesions co-infected with *Staphylococcus aureus* and / or *Enterobacter cloacae*. We were able to isolate *Sporothrix* spp in NNN + Schneider medium in 98% of cases of sporotrichosis. The occurrence of secondary infection was statistically higher in LC cases, however, did not influence the time of epithelialization or of total healing of leishmaniasis or sporotrichosis lesions. The location of the lesion influenced the epithelialization time, and the diameter of the lesion and the used treatment influenced the time for total healing of the lesions in CL cases. Regarding sporotrichosis cases, the age and the visualization of fungi in the histopathological examination influenced the time of epithelialization of the cutaneous lesions, and the time of evolution of the disease and the visualization of fungi in the histopathological examination adjusted by sex influenced in the time of total healing. The sex, occurrence of secondary infection, location, type of scar, age and number of the lesions were significantly different between CL and sporotrichosis and may help in the differential diagnosis between these two diseases.

Key words: Bacteria; Cutaneous leishmaniasis; Fungi; Healing process; Sporotrichosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – Brain Heart Infusion agar
CL – Leishmaniose cutânea
CTLA-4 – Antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos
DNA – Ácido desoxirribonucléico
ELISA – Ensaio imunoenzimático
Fas-L – Proteína transmembrana Fas-ligante
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HR – Hazard ratio
IC – Intervalo de confiança
IDRM – Intradermorreação de Montenegro
IFI – Reação de imunofluorescência indireta
IgG – Imunoglobulina G
IL-10 – Interleucina 10
INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
LapClinVigiLeish – Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
LC – Leishmaniose cutânea
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
Myc – Agar Micosel
NaCl – Cloreto de sódio
NNN – Meio Novy-MacNeal-Nicolle
PAS – Ácido periódico de Schiff
PCR – Reação em cadeia da polimerase
qPCR – PCR em tempo real
RJ – Rio de Janeiro
RNA – Ácido ribonucléico
rRNA – RNA ribossomal
Sb⁵⁺ - Antimônio pentavalente
SDA – Agar Sabouraud dextrose
SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Introdução	Página
Figura 1 - Lesão ulcerada típica de leishmaniose cutânea.	16
Figura 2: Cicatriz atrófica de leishmaniose cutânea com características áreas de hiper/hipocromia.	16
Figura 3 - Lesões de esporotricose: A - forma linfocutânea; B - forma cutânea fixa apresentação ulcerada; C – forma cutânea fixa apresentação verrucosa	22
Figura 4 – Cicatrizes de lesões de esporotricose: A – aspecto em “pingo de vela”; B – aspecto linear.	23
 Artigo 2	
Figura 1 - Número de pacientes por antibióticos e antifúngicos utilizados.	66
 Artigo 3	
Figura 1 - <i>Sporothrix schenckii</i> sensu lato in NNN + Schneider media, magnification 400X	75
Figura 2: Aliquots of NNN + Schneider media growth on Sabouraud agar and Mycosel agar	75
 Artigo 4	
Figura 1: Cicatriz de lesões de esporotricose: A – aspecto pingo de vela; B – aspecto linear; C – aspecto hipertrófico; D – aspecto atrófico.	84

LISTA DE TABELAS

Artigo 1	Página
Tabela 1: Isolated microorganism, antibiotic therapy in the 30 days previously to the skin biopsy, and signs and symptoms suggestive of secondary infection observed in ten patients with cutaneous leishmaniasis lesions in Rio de Janeiro between 2013 and 2016.	57
Tabela 2: Analysis of categorical variables according to the occurrence of secondary infection in patients with cutaneous leishmaniasis treated in Rio de Janeiro 2013 and 2016.	58
Tabela 3: Análise de Kaplan Meier do tempo observado até a epitelização das lesões de 25 pacientes com leishmaniose cutânea atendidos no Rio de Janeiro, entre 2013 e 2016.	59
Tabela 4: Análise de Kaplan Meier até o tempo observado de cicatrização total das lesões de 25 pacientes com LC atendidos no Rio de Janeiro, entre 2013 e 2016.	60
 Artigo 2	
Tabela 1: Descrição da antibioticoterapia usada e sinais e sintomas sugestivos de infecção secundária observados nos seis pacientes com infecção secundária em lesões de esporotricose atendidos no Rio de Janeiro entre 2013 e 2016.	67
Tabela 2: Análise das variáveis categóricas segundo a ocorrência de infecção secundária nos 64 pacientes com lesões ulceradas de esporotricose atendidos no Rio de Janeiro entre 2013 e 2016.	68
Tabela 3: Análise de Kaplan Meyer das variáveis estudadas segundo o tempo de epitelização e cicatrização total dos 64 pacientes com lesões esporotricose, tratados no Rio de Janeiro, entre 2013 e 2016.	69
 Artigo 4	
Tabela 1: Comparação dos dados clínicos, demográficos e laboratoriais coletados, entre os casos de leishmaniose cutânea e esporotricose atendidos entre 2013 e 2016, no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil.	84
Tabela 2: Análise de comparação dos sinais e sintomas relatados na lesão,	86

excluídos os casos com infecção secundária, entre os casos de leishmaniose cutânea e esporotricose atendidos entre outubro de 2013 e fevereiro de 2016 no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil.

Tabela 3: Modelos de Cox simples e múltiplo das variáveis estudadas considerando o tempo de epitelização e tempo de cicatrização, nos casos de leishmaniose cutânea atendidos entre Outubro de 2013 e Fevereiro de 2016, no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil. 88

Tabela 4: Modelos de Cox simples e múltiplo das variáveis estudadas considerando o tempo de epitelização e tempo de cicatrização, nos casos de esporotricose atendidos entre Outubro de 2013 e Fevereiro de 2016, no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil. 89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Leishmaniose tegumentar americana	14
1.1.1 Apresentação clínica da Leishmaniose tegumentar americana.....	15
1.1.2 Diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana.....	17
1.1.3 Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana.....	17
1.2 Esporotricose.....	20
1.2.1 Apresentação clínica da esporotricose.....	20
1.2.2 Diagnóstico da Esporotricose	23
1.2.3 Tratamento da esporotricose.....	24
1.3 Leishmaniose cutânea e esporotricose	26
1.4 Presença de bactérias e fungos nas lesões cutâneas	27
1.5 O processo de cicatrização das lesões.....	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4 ARTIGO 1: EFEITO DA INFECÇÃO SECUNDÁRIA NO TEMPO DE EPITELIZAÇÃO E CICATRIZAÇÃO TOTAL DAS LESÕES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA	35
5 ARTIGO 2: OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO SECUNDÁRIA NAS LESÕES CUTÂNEAS ULCERADAS DA ESPOROTRICOSE E SUA INFLUÊNCIA NO TEMPO DE EPITELIZAÇÃO E CICATRIZAÇÃO TOTAL.....	42
6 ARTIGO 3: IDENTIFICAÇÃO DO <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i> SENSU LATO EM FRAGMENTOS DE LESÃO DE PELE CULTIVADOS EM MEIO nnn PARA DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	73
7 ARTIGO 4: ANÁLISE COMPARATIVA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E SOCIODEMOGRÁFICAS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA E DA ESPOROTRICOSE NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO	77
8 CONCLUSÕES.....	96
9 DESDOBRAMENTOS.....	98
REFERÊNCIAS	99
Anexo I: Parecer consubstanciado do CEP.....	113
Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	118

1 INTRODUÇÃO

Leishmaniose tegumentar americana e esporotricose são doenças endêmicas no estado do Rio de Janeiro (RJ), com superposição das áreas afetadas. Entre 2013 e 2015 foram confirmados 1.859 casos de esporotricose (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2016a) e 90 casos de leishmaniose tegumentar americana (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2016b) no estado do Rio de Janeiro.

A LC e a esporotricose apresentam-se muitas vezes como úlceras cutâneas com aspectos semelhantes, podendo ser confundidas do ponto de vista clínico, o que torna necessário estabelecer diagnóstico diferencial entre ambas. As lesões ulceradas são passíveis de contaminação secundária, e tal ocorrência pode acarretar prejuízo no processo de cicatrização das úlceras.

1.1 Leishmaniose tegumentar americana

A Leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma importante doença endêmica no Brasil. Entre 1985 e 2005, o número médio de casos anuais foi de cerca de 28.500, com coeficiente de detecção médio de 18,5 casos / 100.000 habitantes, afetando todas as unidades da federação (BRASIL, 2013). Nos últimos anos, o número de casos no Brasil diminuiu consideravelmente: entre 2007 e 2015, o número médio de casos anuais de LTA no Brasil foi de 21.865 e o coeficiente de detecção foi de aproximadamente 10,7 casos por 100.000 habitantes (BRASIL, 2016; IBGE, 2016).

O homem é um hospedeiro acidental que adquire a doença pela picada da fêmea infectada do inseto vetor. No Rio de Janeiro, a LTA é causada em quase sua totalidade pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, cuja transmissão depende da adaptação do vetor *Lutzomyia intermedia* ao ambiente domiciliar e peridomiciliar (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). A população de *L. (V.) braziliensis* circulante neste estado parece ser geneticamente homogênea (BAPTISTA et al, 2009).

Após RABELLO (1913) relatar o primeiro caso de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro, casos autóctones descontínuos têm sido registrados. Um maior contato entre indivíduos suscetíveis e vetores, provocado pelo movimento de urbanização, criou as

condições necessárias para manutenção dessa endemia (KAWA E SABROZA, 2002). Entre 2004 e 2013, as áreas com maior ocorrência de casos foram o município do Rio de Janeiro e a região metropolitana do estado, onde observamos a presença de áreas florestais remanescentes da Mata Atlântica ou áreas reflorestadas, como o Parque Estadual da Pedra Branca e a Floresta da Tijuca, funcionando como potenciais reservatórios de parasitos e vetores favoráveis ao desenvolvimento da LTA (VITA et al, 2016).

1.1.1 Apresentação clínica da Leishmaniose tegumentar americana

O quadro clínico da LTA depende das espécies infectantes e também da resposta imune do hospedeiro, principalmente a resposta imune mediada por células (BRASIL, 2013). Outros fatores que afetam a apresentação clínica incluem: quantidade de parasitos inoculados, local da inoculação, presença de comorbidades e o estado nutricional do hospedeiro (FARAH, 1993). *Leishmania (V.) braziliensis* está associada com leishmaniose cutânea e mucocutânea e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com leishmaniose cutânea e com a forma difusa anérgica (SILVEIRA et al, 2004; AZEREDO-COUTINHO et al, 2007; BRASIL, 2013). A maioria dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresenta a forma cutânea típica (BARRAL et al, 1992; BARRAL et al, 1995). Em alguns casos a infecção pode tornar-se subclínica ou evoluir para as formas clínicas de LTA (cutânea ou cutaneomucosa) (GONTIJO E CARVALHO, 2003).

A LC pode ser classificada como: a) forma cutânea localizada, com lesão única ou múltiplas; b) forma cutânea disseminada, caracterizada pelo aparecimento de múltiplas (dez ou mais) lesões ulceradas, pleomórficas, papulosas ou de aparência acneiforme, acometendo vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco; c) forma recidiva cútis, com aspecto de reativação na borda da cicatriz; e d) a rara leishmaniose difusa anérgica, com tubérculos e lesões infiltradas que podem atingir grandes extensões (BRASIL, 2013).

A úlcera típica de LC é indolor e costuma localizar-se em áreas da pele expostas à picada de insetos; com formato arredondado ou ovalado; base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; bordas bem delimitadas e elevadas; fundo avermelhado e com granulações grosseiras (figura 1). A infecção bacteriana associada pode causar dor local e produzir exsudato seropurulento que, ao dessecar-se em crostas, recobre total ou parcialmente o fundo da úlcera (PESSÔA; BARRETO, 1948). Outras apresentações cutâneas menos frequentes podem ser encontradas (BRASIL, 2013).



Figura 1: Lesão ulcerada típica de leishmaniose cutânea. Fonte: Lyra MR.

Após o tratamento, as lesões cutâneas costumam deixar cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa, áreas de hipo ou de hiperpigmentação e traves fibrosas. Algumas vezes podem tornar-se hipertróficas ou podem passar despercebidas, por sua coloração, tamanho, forma ou localização (figura 2) (BRASIL, 2013).



Figura 2: Cicatriz atrófica de leishmaniose cutânea com características áreas de hiper/hipocromia. Fonte: Lyra MR.

Raramente, lesões que não foram tratadas podem apresentar cura espontânea em período de alguns meses a poucos anos (MARSDEN et al, 1984; RIBEIRO, 2015; COTA et al, 2016), podendo também permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas de surgimento posterior (PESSÔA; BARRETO, 1948).

A ocorrência de lesões muito numerosas é incomum. Na leishmaniose disseminada ocorre disseminação hemática com 10 ou mais lesões cutâneas afetando partes não contíguas do corpo, polimórficas, podendo chegar a centenas de lesões; em até 44% destes casos, coexistem lesões mucosas (BRASIL, 2013; ROSA; MACHADO, 2011).

1.1.2 Diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana

O diagnóstico da LTA é realizado pelo exame clínico, com auxílio da história epidemiológica do paciente e de exames complementares. O diagnóstico de certeza se obtém pela demonstração do parasito, por meio da pesquisa direta das formas amastigotas (escarificação, aspiração ou aposição em lâmina de fragmento de lesão cutânea ou mucosa obtido por biópsia) ou cultura [aspirado ou fragmento de lesão cutânea ou mucosa semeado em meios Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) + Schneider]. O diagnóstico também pode ser obtido pela pesquisa de parasitos em cortes histológicos (histopatologia convencional e/ou imunohistoquímica) e pela reação em cadeia da polimerase em fragmento de lesão (FURTADO, 1980; GONTIJO; CARVALHO, 2003; FAGUNDES et al, 2010; QUINTELLA, 2012; BRASIL, 2013, MELLO; MADEIRA, 2015). Alguns autores têm sugerido a associação de diferentes exames como uma forma de melhorar a acuidade diagnóstica (SZARGIKI et al, 2009; FAGUNDES et al, 2010).

Na prática, o teste complementar mais utilizado, associado à resposta imune celular, era a intradermoreação de Montenegro (IDRM), que apresenta cerca de 90% de sensibilidade (FAGUNDES et al, 2012; ANTONIO et al, 2014). No entanto, no Brasil, atualmente não há produção do antígeno e sua distribuição pelo Ministério da Saúde foi interrompida por tempo indeterminado. Dentre os métodos sorológicos estão a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) úteis para o diagnóstico das diferentes formas clínicas e no seu acompanhamento (FURTADO, 1980; BARROSO-FREITAS et al, 2009; BRASIL, 2013).

1.1.3 Tratamento da Leishmaniose tegumentar americana

Os antimoniais pentavalentes constituem os medicamentos de primeira linha para o tratamento das leishmanioses (HERWALDT; BERMAN, 1992). Apesar das variações encontradas ao redor do mundo, tanto na resposta terapêutica aos antimoniais pentavalentes quanto na sensibilidade *in vitro* demonstrada por diferentes isolados de *Leishmania spp.*,

alguns regimes terapêuticos têm sido sugeridos (HERWALDT; BERMAN, 1992; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; OLIVEIRA et al, 2011). As principais diferenças entre os esquemas terapêuticos preconizados estão relacionadas ao uso de antimoniato de meglumina ou de estibogliconato de sódio, via de administração, administração contínua ou intermitente do medicamento, dose diária, duração do tratamento, critérios utilizados para interromper ou para prolongar o tratamento e as espécies e cepas de *Leishmania* envolvidas (BERMAN, 1988; LLANOS-CUENTAS et al, 2008; OLIVEIRA et al, 2011). A formulação do antimonial pentavalente disponível no Brasil é o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (BRASIL, 2013).

O Ministério da Saúde recomenda tratar a LC com antimoniato de meglumina na dose de 10 a 20 mg de antimônio pentavalente (Sb^{5+}) / quilograma de peso / dia durante 20 dias (BRASIL, 2013). Deve-se respeitar o limite máximo de 3 ampolas diárias. Se não houver cicatrização completa após 12 semanas do término do tratamento, o esquema terapêutico deverá ser repetido durante 30 dias apenas uma vez. Em caso de não haver resposta, deve-se utilizar um dos medicamentos de segunda escolha: anfotericina B ou pentamidina (BRASIL, 2013).

No Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClin Vigileish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), os pacientes com LC são tratados rotineiramente com antimoniato de meglumina 5mg Sb^{5+} /kg/dia por 30 dias (OLIVEIRA-NETO et al, 1997a; 1997b; SCHUBACH et al, 2005; LYRA, 2013). Mesmo que não ocorra epitelização total das lesões ao final do tratamento, o mesmo é interrompido e o paciente é reavaliado periodicamente até a epitelização das lesões ulceradas. Nos meses seguintes à epitelização, observa-se o sucessivo desaparecimento das crostas, da descamação, da infiltração e, finalmente, do eritema, com o desenvolvimento de cicatriz atrófica, hipertrófica ou imperceptível (SCHUBACH et al, 2005; LYRA, 2013).

Em pacientes idosos e com comorbidades (cardiopatias, nefropatias, hepatopatias), as interrupções e a dificuldade para concluir o tratamento antimonial são frequentes, mesmo com a dose de 5mg contínuos, em regime de internação ou de hospital-dia. Entretanto, observou-se que, com frequência, as lesões continuavam a progredir para cicatrização durante o período após a suspensão da medicação. Na experiência de alguns autores, esquemas em séries de 10 dias intercaladas por períodos de 10 dias sem medicação, até a cicatrização das lesões, acarretaram menor incidência de efeitos adversos e menor índice de abandono (AZEREDO-COUTINHO; MENDONÇA, 1997; FALQUETO; SESSA, 1997).

Pacientes com poucas lesões cutâneas, que por qualquer motivo apresentem impossibilidade de receber medicação parenteral regular ou que apresentem sinais de toxicidade importante ao antimonial por via sistêmica, poderão ser submetidos ao tratamento com antimoniato de meglumina por via intralésional (VASCONCELLOS et al, 2012; SILVA et al, 2016.). Nesse caso, injeta-se o volume necessário para infiltrar a lesão (geralmente entre 5-20 ml) (DUQUE et al, 2016). A evolução das lesões costuma ser semelhante àquela observada com tratamento contínuo ou em séries.

Em todos os casos os pacientes devem ser monitorados com exame clínico, eletrocardiograma, hemograma, provas de função hepática, renal e pancreática (LYRA et al, 2016).

Os critérios utilizados para considerar a cura clínica da doença consistem em: lesões cutâneas cicatrizadas e ausência de lesões mucosas em atividade. Adicionalmente, espera-se que anticorpos IgG anti-*Leishmania* estejam ausentes no soro ou detectados em títulos baixos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010). Para controle de cura após o tratamento é necessária a reavaliação regular dos pacientes.

PASSOS et al (2000) definem recidiva como ocorrência de nova lesão na cicatriz cutânea; ocorrência de lesão mucosa em paciente com cicatriz de lesão cutânea; ou reativação na cicatriz de lesão mucosa, e destaca a IDRM negativa por ocasião do diagnóstico como fator preditor de recidiva da doença. Para o Ministério da Saúde recidiva é o “reaparecimento de lesão leishmaniótica em qualquer parte do corpo no período de até um ano após a cura clínica, descartada a possibilidade de reinfeção, considerando-se a história da doença atual e a realidade epidemiológica de transmissão do agravo bem como os possíveis deslocamentos do paciente” (BRASIL, 2013)

A falha terapêutica é definida pelo Ministério da Saúde como ausência de remissão clínica após dois esquemas terapêuticos regulares (BRASIL, 2013). Para RODRIGUES et al (2006) o insucesso terapêutico foi definido como a não cicatrização da lesão cutânea ou a sua recrudescência durante os três meses de seguimento após o término do primeiro esquema terapêutico, independente da regularidade do tratamento.

O sucesso relatado na literatura com os antimoniais varia largamente (ROMERO et al, 2001), com número crescente de relatos de falha do tratamento com estas medicações (LAWN, 2003). Alguns dos fatores que estão associados com falha terapêutica são: o número de lesões, tratamento precoce, esquema de tratamento incompleto, resultado do IDRM e tempo de evolução da doença (RODRIGUES et al, 2006; ANTONIO et al, 2014).

1.2 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica causada, na maior parte das vezes, por implantação traumática do fungo dimorfo *Sporothrix schenckii sensu lato* (RANGEL-GAMBOA et al, 2016). A doença tem distribuição mundial, com predomínio em áreas tropicais e temperadas (CHAKRABARTI et al, 2015). Acomete todas as faixas etárias, e em algumas regiões, a diferença na distribuição dos casos por idade e gênero está relacionada à ocupação e exposição ao fungo. A transmissão está correlacionada principalmente a atividades agrícolas, jardinagem, caça a tatus e contato com gatos infectados pelo fungo (SCHUBACH et al, 2005b; SCHUBACH et al, 2008; BARROS et al, 2008; TAKENAKA et al, 2009, BARROS, 2011a).

Trata-se de uma doença endêmica no estado do Rio de Janeiro (RJ), onde foi relatada a espécie *Sporothrix brasiliensis* correlacionada a apresentações clínicas típicas ou pouco habituais da doença (ALMEIDA-PAES et al, 2014). Casos humanos de esporotricose foram ocasionalmente diagnosticados no RJ desde 1936 (GONÇALVEZ; PERYASSU, 1954). Em 1998, uma epidemia zoonótica envolvendo humanos, cães e gatos foi detectada (BARROS, 2001). As mulheres acima de 40 anos envolvidas em atividades domésticas e no cuidado de gatos têm sido predominantemente afetadas nesta epidemia/endemia (BARROS et al, 2008; SCHUBACH et al, 2008). A maior incidência de casos de esporotricose ocorre nos municípios da Região Metropolitana I, que é a de maior população e com ocupação urbana mais antiga (SILVA et al, 2012). O perfil epidemiológico da doença no estado demonstrou um aumento crescente no número e na dispersão dos casos (BARROS et al, 2004; SILVA et al, 2012; SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2016a). Entre 2013 e 2015 foram confirmados 1.859 casos de esporotricose no estado (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2016a).

1.2.1 Apresentação clínica da esporotricose

As lesões costumam ser restritas à pele, tecido celular subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes (BARROS et al, 2011), entretanto eventuais formas sistêmicas têm sido descritas (GUTIERREZ-GALHARDO et al, 2010).

A forma clínica parece depender em parte do tamanho do inóculo, da profundidade da inoculação, da virulência e tolerância térmica da cepa e do estado imune do hospedeiro (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al, 2009; BARROS et al, 2011). É classificada em formas

cutânea, mucosa e extracutânea (BARROS et al, 2011). A forma cutânea ocorre geralmente após pequena inoculação traumática e pode permanecer localizada (forma cutânea fixa) ou se estender ao longo do trajeto linfático (forma linfocutânea); mais raramente, pode haver disseminação hemática do fungo com acometimento exclusivamente cutâneo caracterizando a forma cutânea disseminada (BARROS et al, 2011).

Dentre todas as apresentações da esporotricose, a mais frequente é a linfocutânea, que ocorre em mais de 70% dos casos (figura 3A). A lesão primária surge geralmente nas extremidades superiores, face ou membros inferiores, correspondendo aos locais mais expostos a traumas. Tem início como lesão eritematopapulosa ou pustulosa, que evolui com formação de nódulo ou placa que tende a ulcerar ou assumir aspecto verrucoso. Com a progressão do quadro, surgem linfangite e lesões secundárias (nódulos ou gomas) que seguem o trajeto de vasos linfáticos, com características semelhantes à primeira (RAMOS-E-SILVA et al, 2007; BARROS et al, 2011)

A forma cutânea fixa é representada por lesão única no local da inoculação, frequentemente ulcerada e com bordas infiltradas (figura 3B); pode também apresentar-se como lesão vegetante, verrucosa (figura 3C), tuberosa, ou como placa infiltrada, sem envolvimento linfático (BARROS et al, 2011) e algumas vezes circundada por pápulas “satélites” (REIS et al, 2013). É considerada uma forma frequente em crianças (TLOUGAN et al, 2009).



Figura 3 - lesões de esporotricose: A - forma linfocutânea; B - forma cutânea fixa, apresentação ulcerada; C – forma cutânea fixa, apresentação verrucosa. Fonte: Lyra MR.

A forma cutânea disseminada se caracteriza por múltiplas lesões em áreas não contíguas da pele, sem envolvimento extracutâneo; podem coexistir lesões do tipo fixo e linfocutâneo no mesmo paciente (BARROS et al, 2011). Geralmente está associada a imunossupressão (CARVALHO et al, 2002; MOREIRA et al, 2015). Entretanto, em áreas de epidemia transmitida por gatos infectados, podem ocorrer múltiplos inóculos decorrentes do convívio com esses animais (BARROS et al, 2003). Embora a patogênese seja diferente em cada caso, pode ser difícil diferenciar se a apresentação clínica se deve à disseminação a partir de uma lesão única ou de múltiplas inoculações (BARROS et al, 2011).

A forma extracutânea é rara e de difícil diagnóstico; frequentemente é encontrada em indivíduos HIV positivos ou imunodeprimidos. Pode ocorrer por contiguidade ou disseminação hemática, afetando eventualmente o tecido ósseo (MORRIS-JONES, 2002; VILELA et al, 2007; BARROS et al, 2011; EUSTACE et al, 2013). A forma pulmonar primária pode ocorrer, resultando da inalação do fungo, sendo geralmente associada à doença pulmonar obstrutiva crônica, alcoolismo, uso crônico de corticóides e doenças

imunossupressoras (RAMIREZ et al, 1998; BARROS et al, 2011). Formas graves com acometimento do sistema nervoso central também são descritas (GUTIERREZ-GALHARDO et al, 2010).

Após o tratamento, as lesões ulceradas de esporotricose podem apresentar aspectos cicatriciais muito particulares (figura 4): algumas lesões assumem aspecto cicatricial atrófico entremeadas por áreas hipertróficas que conferem a cicatriz um aspecto característico descrito como cicatrização em pingo de vela (figura 4A); outros pacientes apresentam cicatrizes que assumem característica configuração linear independente do formato original da lesão ou das linhas de tensão da pele (figura 4B) (LYRA et al, 2015).

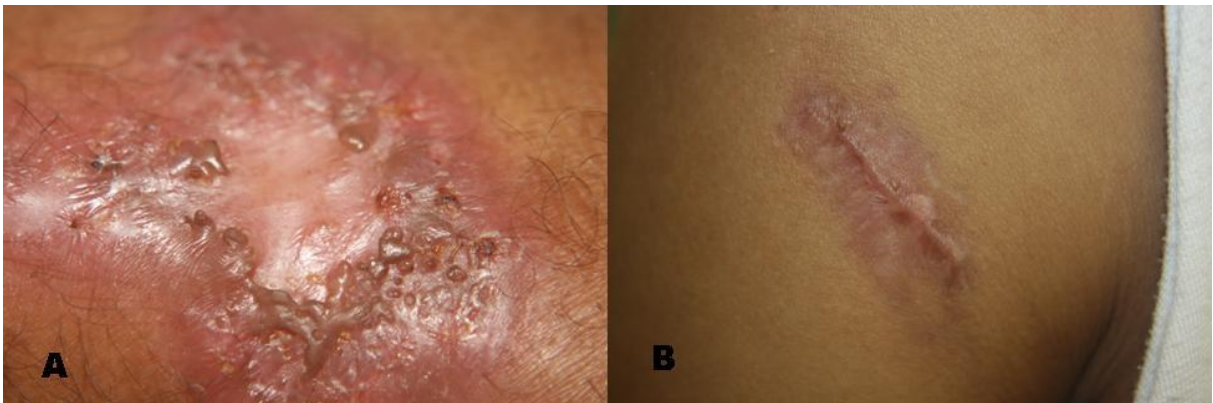


Figura 4 – Cicatrizes de lesões de esporotricose: A – aspecto em “pingo de vela”; B – aspecto linear. Fonte: Lyra MR.

1.2.2 Diagnóstico da Esporotricose

O diagnóstico da esporotricose deve levar em conta dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BARROS et al, 2011). Espécimes tais como fragmentos de lesões cutâneas coletados através de procedimentos de biópsia, aspirado de pus de gomas e/ ou raspado de pus ou escamas de lesões podem ser utilizados para realização de cultura em meios apropriados para fungos. Nos casos de infecções disseminadas, outros espécimes clínicos podem ser utilizados, como urina, escarro, sangue, líquido sinovial ou liquor (BARROS et al, 2011).

O exame direto do espécime clínico com hidróxido de potássio a 10% permite a visualização das células leveduriformes do parasito em amostras oriundas de gatos infectados, uma vez que, a riqueza de parasitos torna-os facilmente visíveis por esta técnica (BARROS et al, 2011). Entretanto, a presença de elementos fúngicos dificilmente pode ser observada em seres humanos desta forma por essa metodologia.

O exame histopatológico de tecidos obtidos por biópsia permite a visualização de leveduras em cerca de 35% dos casos. O fungo pode ser observado pela coloração com a hematoxilina-eosina, mas sua visualização é facilitada por colorações como a prata metenamina de Gomori ou o ácido periódico de Schiff (PAS). A esporotricose se caracteriza histologicamente por reação inflamatória mista, supurativa e granulomatosa, na derme e no tecido subcutâneo, frequentemente acompanhada por microabscessos e fibrose (QUINTELLA et al, 2011; QUINTELLA et al, 2012).

A cultura para fungos é o padrão ouro para o diagnóstico da esporotricose. O diagnóstico definitivo é obtido através do isolamento e identificação de *Sporothrix spp.* em meios de cultura como agar Sabouraud com cloranfenicol ou agar micobiótico (BARROS et al, 2011). Após 5 a 7 dias, crescem colônias filamentosas hialinas, que posteriormente desenvolvem uma coloração escura. Para identificar um isolado como sendo *Sporothrix spp.*, deve-se demonstrar o dimorfismo por cultivo em meios enriquecidos, como Brain Heart Infusion agar (BHI), agar chocolate ou agar sangue a 35-37° C por 5 a 7 dias. Após conversão à fase leveduriforme, as colônias adquirem aspecto cremoso e cor amarelada ou acastanhada (BARROS et al, 2011).

A sorologia pode ser utilizada como auxiliar para o diagnóstico. Atualmente o método mais utilizado é o ensaio imunoenzimático. Os resultados dos testes de detecção de anticorpos fornecem um diagnóstico presuntivo e requerem associação clínica e epidemiológica para determinação do diagnóstico final (BARROS et al, 2011).

1.2.3 Tratamento da esporotricose

O itraconazol é o medicamento de primeira escolha para o tratamento da esporotricose, apresentando baixa toxicidade, boa tolerância e grande eficácia, mesmo que seja necessário um longo tempo de tratamento (KAUFFMAN et al, 2007; BARROS et al, 2011a). A dose de itraconazol varia de 100 a 200mg/dia, via oral, para formas cutâneas fixas e linfocutâneas. Dose de 400mg/dia, por via oral, é administrada em pacientes com a forma cutânea com resposta insatisfatória às doses convencionais; ou nas formas osteoarticulares. Imunocomprometidos ou portadores de esporotricose sistêmica devem receber o tratamento inicial com anfotericina B (BARROS et al, 2011a) e, posteriormente complementar o tratamento com 400mg/dia de itraconazol por vários meses. A dose recomendada para crianças é de 5mg/kg/dia (BARROS et al, 2011a). Crianças com mais de 20 Kg devem receber a mesma dose utilizada para adultos de 100mg/dia. Nas grávidas, o itraconazol é

contraindicado e o tratamento pode ser feito com termoterapia (BARROS et al, 2011a; FERREIRA et al, 2012). BARROS et al (2011b) relataram excelente resposta terapêutica ao itraconazol em pacientes tratados com doses de 100mg/dia, via oral, encontrando baixa frequência de efeitos adversos e de falhas ao tratamento no RJ.

A terbinafina também pode ser utilizada no tratamento da esporotricose, estando principalmente indicada para pacientes com impossibilidade de utilizar itraconazol (FRANCESCONI et al, 2009; BARROS et al, 2011b), particularmente em virtude do grande número de interações medicamentosas do mesmo. A dose de 250mg/dia de terbinafina para adultos é tida como efetiva e bem tolerada (FRANCESCONI et al, 2009).

O iodeto de potássio, tradicionalmente usado para esporotricose, foi substituído pelo itraconazol como tratamento de primeira escolha devido aos frequentes efeitos adversos daquele medicamento como gosto metálico, síndrome gripal, lacrimação excessiva, distúrbios gastrointestinais, aumento da parótida, erupções acneiformes ou papulopustulosas, inflamação lesional, hipotireoidismo ou hipertireoidismo, iododerma, irritabilidade cardíaca, vasculite, psoríase pustulosa, edema pulmonar, urticária e angioedema, mialgia, linfadenopatia e eosinofilia. (KAUFFMAN et al, 2007; BARROS et al, 2011a; MAHAJAN, 2014). No entanto, devido ao alto custo do itraconazol, o iodeto de potássio ainda é utilizado na esporotricose. Seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente elucidado (BARROS et al, 2011a). O início do tratamento é geralmente realizado com 5 gotas da solução saturada de iodeto de potássio 3 vezes ao dia, aumentando-se uma gota em cada dose por dia até um máximo de 20 gotas 3 vezes ao dia (DONADEL et al, 1993). Boa resposta clínica ao tratamento com doses mais baixas que o esquema convencional foram relatados por MACEDO et al (2015). YAMADA et al (2011) descreveram que o tratamento com iodeto de potássio com 3 a 6 g por dia, por via oral, resultou em cura de 94,7% dos pacientes, com poucos efeitos adversos. Recidiva após tratamento inicial bem sucedido com iodeto de potássio ocorreu em dois de 51 pacientes (YAMADA, et al, 2011).

Nos casos de esporotricose com formas disseminadas ou em pacientes imunocomprometidos, a anfotericina B é indicada para o tratamento inicial por apresentar boa penetração através da barreira hematoencefálica (KAUFFMAN et al, 2007; BARROS et al, 2011a; FREITAS et al, 2012). Em grávidas, a anfotericina B pode ser utilizada após 12 semanas de gestação, naturalmente pesando os riscos e benefícios (BARROS et al, 2011a).

São raros os casos de falha terapêutica com o uso do itraconazol. Numa coorte de 645 pacientes com esporotricose tratados com esta medicação foram encontrados apenas 3 indivíduos com falha ao tratamento e 6 com reativação (BARROS et al, 2011b). A baixa

frequência da falha terapêutica dificulta a realização de estudos para avaliar fatores associados. ALMEIDA-PAES et al, 2016 em um estudo com sete casos de falha terapêutica sugeriram que a susceptibilidade antifúngica in vitro à terbinafina e ao itraconazol não desempenha um papel importante nesta falha terapêutica, e que o *S. brasiliensis* não parece ser suscetível a aquisição de resistência durante tratamento antifúngico prolongado.

1.3 Diagnóstico diferencial entre leishmaniose cutânea e esporotricose

É grande a semelhança clínica entre LC e esporotricose. As formas cutâneas fixas de esporotricose correspondem a cerca de 30% dos casos e podem ser ulceradas, ulcero-vegetantes ou verrucosas, simulando lesões de LC. Em ambas as doenças, são comuns a presença de “pápulas satélites” perilesionais. Por outro lado, as lesões de LC podem ser acompanhadas de lesões gomosas que tendem a acompanhar o trajeto linfático, assumindo o característico aspecto esporotricóide (SAMPAIO et al, 1996). A co-infecção entre as duas doenças já foi relatada anteriormente na Colômbia (AGUDELO et al, 1999). Além das semelhanças clínicas apresentadas, ambas as doenças são endêmicas no estado do Rio de Janeiro com superposição das principais áreas afetadas, o que torna o diagnóstico diferencial ainda mais difícil.

O diagnóstico de certeza se dá pela visualização do microorganismo isolado. Na análise histopatológica, ambas as enfermidades apresentam padrões semelhantes e baixas frequência de detecção de microorganismos (QUINTELLA, 2012). MELLO et al (2011), relataram um caso de visualização de *Sporothrix sp.* no exame direto com tamanho e formato semelhante a amastigotas. Estes autores alertaram para a necessidade de pessoal qualificado e de leituras cuidadosas nos exames diretos, procurando observar características morfológicas específicas do parasito, a fim de diagnosticar adequadamente o caso. A avaliação de qPCR e PCR convencional mostrou-se potencialmente útil para o diagnóstico diferencial de LC e esporotricose, no entanto, uma atenção especial deve ser focada na contaminação com fungos ambientais da ordem *Ophiostomatales* que podem provocar resultados falso-positivos para esporotricose (RODRIGUES-BRITO et al, 2015).

Em estudo anterior, BARROS et al (2005) observaram que alguns indivíduos com suspeita de LC e história epidemiológica compatível, IDRM e sorologia para *Leishmania* positivas, na realidade apresentavam esporotricose. Assim, no diagnóstico diferencial entre esporotricose e LC, deve-se ter cuidado na interpretação dos resultados, especialmente em regiões endêmicas para as duas doenças, com instalações laboratoriais limitadas onde o

diagnóstico é baseado em evidências clínico-epidemiológicas e IDRMs. Essa semelhança clínica, histopatológica, e de resultados sorológicos, além da IDRm positiva em casos de esporotricose, também ocorreram em cães de áreas de superposição das duas doenças, reforçando a necessidade de demonstração do agente etiológico para a confirmação do diagnóstico (SANTOS et al, 2007).

1.4 Presença de bactérias e fungos nas lesões cutâneas

A quebra da barreira cutânea predispõe à infecção bacteriana secundária (ROSSOLINI; STEFANI, 2009). Úlceras crônicas constituem um ambiente microbiológico complexo com uma microbiota mista, que muda com o tempo, e que pode ser classificada como contaminação, colonização, “colonização crítica” ou infecção, caracterizadas, respectivamente, pelo aumento progressivo da densidade bacteriana e/ou de penetração tecidual de bactérias, bem como pela resposta inflamatória resultante (LANDIS, 2008).

A contaminação refere-se à simples existência de bactérias na lesão ulcerada. Todas as lesões ulceradas crônicas são contaminadas, ou seja, nelas as bactérias estão em pequena quantidade e não se multiplicam; não há evidência de dano pela bactéria na lesão ulcerada (LANDIS, 2008). A simples presença de microrganismos não implica necessariamente em retardo na cicatrização (VERA et al, 2001; LANDIS, 2008; KÖRBER et al, 2010).

A colonização é o próximo passo na relação entre hospedeiro e microorganismo: as bactérias se multiplicam, mas não há evidência de invasão tecidual, e a lesão ulcerada evolui para cicatrização. Em muitos casos, a colonização é polimicrobiana (LANDIS, 2008). A colonização crítica é o passo crucial para o desequilíbrio na relação bactéria e hospedeiro; nessa fase, ocorre invasão tecidual após ruptura da barreira de proteção do hospedeiro, geralmente nas camadas superficiais da lesão ulcerada (LANDIS, 2008). O processo de colonização pode evoluir para infecção ou sepse (KÖRBER et al, 2010).

A infecção é definida a partir do momento em que as bactérias rompem as camadas de defesa do hospedeiro, invadindo e danificando os tecidos mais profundos; o número de bactérias aumenta e a cicatrização da úlcera é interrompida, podendo ocorrer piora da lesão. Normalmente, os danos envolvem a derme e hipoderme. Na sequência do processo, as bactérias podem ter acesso à circulação sistêmica e disseminar-se para outros órgãos (LANDIS, 2008).

As infecções secundárias se desenvolvem em áreas de pele já danificada e a

subsequente invasão de áreas circunvizinhas pode agravar e prolongar a doença. Essa infecção secundária pode ocorrer quando a integridade da pele foi quebrada, ou o meio imune local é alterado pela condição primária da pele, permitindo a infecção por bactérias (BERGER, 2008).

A probabilidade de infecção varia diretamente com o número de bactérias e sua virulência, e inversamente com a resistência do hospedeiro (LANDIS, 2008). A expressão de peptídeos antimicrobianos nas úlceras crônicas poderia desempenhar um papel no desenvolvimento local de infecção (DRESSEL et al, 2009) e na cicatrização de lesões cutâneas (ROUPÉ et al, 2010).

Os sinais clássicos de infecção bacteriana são a presença de secreção purulenta associada a algum dos sinais cardinais de inflamação (eritema, aumento de temperatura, dor, induração), além de outros sinais indiretos como exsudato não purulento, tecido de granulação friável ou facilmente sangrante, odor fétido, retardo na cicatrização, aumento do tamanho da lesão e da temperatura perilesional (LANDIS, 2008; LIPSKY; HOEY, 2009; FIERHELLER; SIBBALD, 2010).

A infecção por fungos em lesões crônicas também pode ser observada. Nos Estados Unidos, foi encontrada uma positividade de 23% para fungos em úlceras crônicas (úlceras de decúbito, úlcera de pé diabético, ferida cirúrgica sem cicatrização, úlcera venosa de perna) (DOWD et al, 2011a). Os fungos mais encontrados foram do gênero *Candida*, no entanto, *Curvularia*, *Malassezia*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Engodontium* e *Trichophyton* também foram encontrados como componentes predominantes destas infecções polimicrobianas (DOWD et al, 2011a). Na Europa, HENCKAERTS et al (2012) relataram um caso de eumicetoma a partir de lesão ulcerada em "pé diabético".

O diagnóstico de infecção bacteriana ou fúngica em uma lesão ulcerada é importante para que o tratamento adequado seja providenciado, caso necessário. O conhecimento da susceptibilidade das bactérias locais aos antimicrobianos é também importante para o sucesso terapêutico (RAJAN, 2012). O aumento da incidência de microrganismos resistentes a antibióticos e o aumento do custo dos métodos terapêuticos para desinfecção de lesões ulceradas tornam importante o diagnóstico correto e precoce (CADOGAN et al, 2011). A estratégia terapêutica deve levar em conta outros aspectos, como a desnutrição (STECHMILLER, 2010).

A cicatrização de lesões cutâneas é um evento complexo que depende de interação coordenada entre células inflamatórias e mediadores e que pode ser classificada em três fases principais: fase inflamatória, fase proliferativa, e fase de remodelação. Nas úlceras crônicas, a

fase inflamatória é prolongada (ÖZTURK et al, 2011). O manejo correto de lesões ulceradas que não cicatrizam muitas vezes implica na preparação do leito da lesão através de debridamento, umidificação e contenção da colonização e da infecção bacteriana (ÖZTURK et al, 2011).

As técnicas tradicionais de isolamento de microrganismos apresentam limitações na avaliação das infecções secundárias de lesões ulceradas crônicas. A cultura de fragmentos teciduais de úlceras crônicas coletados através de procedimento de biópsia geralmente revela poucos microrganismos (BASU et al, 2009), em média 3 espécies de bactérias (HAN et al, 2011). A coleta de fragmento de lesão através de biópsia favorece a identificação de microrganismos nas camadas mais profundas da pele. A coleta de material por "swab" costuma implicar na detecção de maior diversidade de microrganismos (COOPER et al, 2009) pois favorece o isolamento de bactérias encontradas na superfície da lesão.

Entretanto, uma expressiva porcentagem de lesões ulceradas crônicas de membros inferiores clinicamente consideradas infectadas ou “criticamente colonizadas” exibiu ausência ou escassez de bactérias quando o material coletado por "swab" foi submetido a cultura (MILLER et al, 2011). Técnicas mais recentes, como pirosequenciamento de DNA de alto rendimento (“high-throughput pyrosequencing”) (HAN et al, 2011; TUTTLE et al, 2011), microscopia de epifluorescência, hibridização fluorescente *in situ*, bioensaio para medida de detecção de *quorum* de população microbiana (“quorum-sensing”) (HAN et al, 2011) podem revelar um número superior de microrganismos em úlceras crônicas (TUTTLE et al, 2011): média de 17 para “high-throughput pyrosequencing” (HAN et al, 2011) e até 22 filotipos pela análise sequencial de RNA ribossomal (rRNA) (FRANK et al, 2009). Utilizando microscopia de epifluorescência, HAN et al (2011) demonstraram a organização bacteriana em biofilmes (agregados das células entre si numa superfície) confluentes, além de bactérias isoladas dispersas, com grande proporção de anaeróbios, bastonetes Gram-negativos e cocos Gram-positivos. Utilizando-se técnica de sequenciamento de rRNA, a maioria das sequências teve identidade com espécies sabidamente comensais; porém, muitas pertenciam aos filotipos *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridiales* e *Pseudomonas* (FRANK et al, 2009).

Uma tendência de substituição de espécies bacterianas Gram-positivas por Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) foi detectada em um centro europeu especializado em tratamento de úlceras crônicas, embora ainda com predomínio de *Staphylococcus aureus*. Em 10% dos pacientes foi identificada colonização com *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (KÖRBER et al, 2010), o que deve ser levado em consideração no planejamento terapêutico.

A identificação de fatores predisponentes à infecção bacteriana secundária é fundamental para o sucesso terapêutico nas úlceras cutâneas. Um centro asiático revelou predomínio de *Pseudomonas aeruginosa*, especialmente em pacientes com diabetes mellitus, úlceras de membros inferiores e com área superior a 20 cm² (BASU et al, 2009). A maior parte dos patógenos resistentes aos antibióticos convencionais (*Pseudomonas* spp, MRSA, *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp) ocorreu em pacientes diabéticos (BASU et al, 2009).

Estudos de contaminação fúngica em lesões cutâneas específicas são mais raros. Pacientes diabéticos com úlceras de membros inferiores podem apresentar infecções fúngicas das lesões cutâneas ulceradas, com um possível retardo na sua cicatrização, e a pesquisa de fungos deveria ser realizada nos pacientes diabéticos com lesões ulceradas de membros inferiores (CHELLAN et al, 2010). Contaminação por fungos pode ser encontrada em úlceras traumáticas (TURKSEN et al, 2010). Entre os pacientes com queimaduras, pode haver presença de fungos nas lesões cutâneas em muitos casos, sendo considerados como predisponentes as infecções bacterianas prévias e o uso de antibióticos de largo espectro, podendo haver implicações no prognóstico destes pacientes (ROSANOVA et al, 2011).

A utilização conjunta de métodos de cultura e de técnicas moleculares de detecção permite uma melhor caracterização da diversidade microbiana de lesões ulceradas crônicas (FRANK et al, 2009). O diagnóstico molecular pode ainda ser utilizado como guia para introdução de terapia sistêmica ou tópica, com melhora dos índices de obtenção de cicatrização completa, bem como do tempo para sua ocorrência (DOWD et al, 2011b). Úlceras de estase com maior abundância e diversidade de bactérias demandaram maior tempo para sua cicatrização, em estudo longitudinal comparando os métodos de cultura tradicional e novas técnicas moleculares de detecção bacteriana (TUTTLE et al, 2011).

Pacientes diagnosticados com LC frequentemente apresentam secreção purulenta e crostas nas lesões. A presença de infecção secundária por bactérias pode dificultar a cicatrização além de prejudicar a detecção de *Leishmania* spp no diagnóstico parasitológico (SADEGHIAN et al, 2011, NAVARRO et al, 2009).

A incidência de infecção secundária em lesões de LC pode variar entre 23,6 a 81% (VERA et al, 2001; GONÇALVES et al, 2009; NAVARRO et al, 2009; SADEGHIAN et al, 2011). VERA et al (2001) utilizou fragmento de lesão para identificação das bactérias enquanto os demais estudos utilizaram swab de lesão. Dentre as principais bactérias isoladas de lesões cutâneas de leishmaniose encontramos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (VERA et al, 2001; GONÇALVES et al, 2009; NAVARRO et al, 2009; SADEGHIAN et al, 2011). VERA et al,

(2002) isolaram *Corynebacterium diphtheriae* em 8,3% (n=7) dos pacientes com LC. No entanto, devido ao pequeno número de indivíduos, não foi possível estudar o comportamento dessa bactéria na lesão nem a sua influência no processo de cicatrização.

A infecção secundária na lesão de LC também pode ocorrer por fungos. AGUDELO et al, 1999 relataram 3 casos de co-infecção de LC com esporotricose na Colômbia. Os autores atribuem os achados ao costume de algumas pessoas tentarem drenar ou remover as crostas da lesão usando espinhos ou lascas de madeira, o que facilitaria a entrada de bactérias e de fungos como *Sporothrix schenckii*.

NAVARRO et al (2009), na Venezuela, sugerem a utilização de antibiótico associado ao antimoniato de meglumina para o tratamento da LC. SADEGHIAN et al (2011) observaram que o efeito terapêutico do antimoniato de meglumina foi diminuído nas lesões cutâneas com infecção bacteriana secundária. Tais autores sugeriram que, em casos de não resposta ao tratamento, as lesões sejam avaliadas para infecção bacteriana antes do retratamento. No entanto, VERA et al (2001) não observaram influência da infecção bacteriana secundária, restrita à úlcera, no processo de reepitelização completa das lesões de LC.

As lesões ulceradas de esporotricose apresentam frequentemente secreção purulenta (que pode muitas vezes ser causada pelo fungo). No entanto, não conseguimos encontrar referência científica sobre infecção bacteriana secundária nessas lesões.

1.5 O processo de cicatrização das lesões

O processo de cicatrização das lesões consiste em perfeita e coordenada cascata de eventos celulares, moleculares e bioquímicos que interagem para que ocorra a reconstituição tecidual (CAMPOS et al, 2007). Esse processo incluem reepitelização, síntese da matriz e neovascularização através das fases inflamatória, proliferativa e de maturação (TAZIMA et al, 2008). O reparo do tecido da pele resulta em um amplo espectro de tipos de cicatrizes, incluindo cicatrizes normotróficas, atróficas, contraturas, hipertróficas e quelóide (BAYAT et al, 2003).

As cicatrizes alargadas (esticadas) aparecem quando as linhas de cicatrizes cirúrgicas são gradualmente esticadas e alargadas. São tipicamente planas, pálidas, moles, assintomáticas, sem elevação, espessamento ou nodularidade, o que as distingue das cicatrizes hipertróficas. As cicatrizes atróficas são planas e deprimidas, geralmente pequenas e muitas vezes redondas com um centro recuado ou invertido. As contraturas cicatriciais ocorrem

quando a cicatriz não está completamente “madura”, muitas vezes tendem a ser hipertróficas e são tipicamente incapacitantes e disfuncionais. As cicatrizes hipertróficas são cicatrizes elevadas que respeitam os limites da lesão original e são muitas vezes eritematosas, inflamadas, pruriginosas e até dolorosas. São mais comuns em determinadas áreas, como ombros e colo. Cicatrizes quelóides são cicatrizes elevadas que não respeitam os limites da lesão original podendo invadir a pele normal circunjacente. Costumam ser pruriginosas, dolorosas e podem atingir grandes dimensões, assumindo, em alguns casos, aspecto tumoral. Histologicamente, os quelóides apresentam um padrão nodular de fibras colágenas (BAYAT et al, 2003). Podem surgir a partir de lesões pré-existentes ou ter início espontâneo em áreas de pele sã.

Diversos fatores podem influenciar negativamente a cicatrização de lesões ulceradas de diversas etiologias, dentre eles os principais são: isquemia, infecção, técnica cirúrgica, corpo estranho e edema / pressão tecidual elevada, diabetes melito, deficiências vitamínicas, hipotireoidismo, doenças hereditárias (síndrome de Ehler-Danlos), alterações da coagulação, idade, trauma grave, queimaduras, sepse, insuficiência hepática e renal, insuficiência respiratória, tabagismo, radioterapia, desnutrição, e uso de medicamentos como corticosteróides, drogas antineoplásicas, ciclosporina A, colchicina e penicilamina (CAMPOS et al, 2007). BORGES et al (2016) observaram que a cura de feridas cirúrgicas complexas esteve associada ao tipo de intervenção cirúrgica, consumo de etanol, tipo de cobertura, extensão e tempo de existência da ferida. De acordo com SGONC; GRUBER (2013) os distúrbios crônicos de cicatrização de feridas são um problema comum na população idosa. Com o avanço da idade, comorbidades e uso de medicamentos que afetam negativamente a cicatrização de feridas, como corticosteróides e drogas quimioterápicas, tornam-se mais comuns.

Na prática clínica ainda persistem dúvidas sobre os fatores que retardam o processo de cicatrização das lesões de leishmaniose e esporotricose.

2 JUSTIFICATIVA

Estudos prévios demonstraram a ocorrência de infecção bacteriana secundária como complicação de úlceras de diversas etiologias, inclusive na LC (EDRISSIAN et al, 1990; VAN DER VLIT D et al, 2006; SHIRAZI et al, 2007; GONÇALVES et al, 2009).

As espécies bacterianas encontradas nas úlceras podem fazer parte da microbiota comensal, ou constituir-se por bactérias patogênicas.

Existem evidências do efeito negativo da infecção bacteriana secundária no desfecho do tratamento sistêmico de úlceras de Leishmaniose tegumentar americana na forma cutânea (LC) com antimoniato de meglumina (SADEGHIAN et al, 2011).

O estudo da associação entre a espécie de bactéria identificada no momento do diagnóstico e o processo de cicatrização das úlceras poderia revelar diferenças conforme a espécie isolada. Há estudos anteriores sobre a influência da microbiota na cicatrização de úlceras de leishmaniose, inclusive com recomendação de uso de antibioticoterapia. No entanto, não encontramos na literatura estudos que relatassem o isolamento de bactérias ou fungos em lesões específicas de esporotricose e sua relação com o processo de cicatrização. Este estudo visa estudar a presença ou ausência de bactérias e/ou fungos nas lesões ulceradas de leishmaniose cutânea ou de esporotricose, verificando sua influência no processo de epitelização e cicatrização.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Comparar a influência de infecção secundária e de outros fatores no processo de cicatrização das lesões ulceradas de leishmaniose cutânea ou de esporotricose.

3.2 Objetivos específicos

1 - Verificar a presença de bactérias ou fungos nas lesões ulceradas de LC e de esporotricose;

2 - Descrever as espécies de bactérias e fungos mais frequentes nas lesões ulceradas de LC e de esporotricose;

3 - Verificar a associação entre a presença ou não de bactérias e/ou fungos e outros fatores nas lesões ulceradas de LC ou de esporotricose com o tempo necessário para a ocorrência de epitelização e de cicatrização;

4 - Descrever o uso de antibioticoterapia e/ou terapia antifúngica tópica e/ou sistêmica nos 30 dias prévios à realização da biópsia para a confirmação diagnóstica;

5 - Identificar a ocorrência de contaminação por bactérias e/ou fungos nas culturas de fragmento de lesão cutânea para *Leishmania spp.* e para *Sporothrix spp.*, correlacionando com as bactérias e/ou fungos isolados em meios específicos para estes agentes, de fragmentos das mesmas lesões ulceradas de LC ou de esporotricose.

4 ARTIGO 1: EFEITO DA INFECÇÃO SECUNDÁRIA NO TEMPO DE EPITELIZAÇÃO E CICATRIZAÇÃO TOTAL DAS LESÕES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

ANTONIO, L. F.; LYRA, M. R.; SAHEKI, M. N.; SCHUBACH, A. O.; MIRANDA, L. F. C.; MADEIRA, M. F.; LOURENÇO, M. C. S.; FAGUNDES, A.; RIBEIRO, E. A. S.; BARRETO, L.; PIMENTEL, M. I. F. Effect of secondary infection on the time for epithelialization and for total healing of cutaneous leishmaniasis lesions. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2017 (Aceito)

O artigo foi submetido à revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz e apresenta a incidência de infecção secundária nas lesões de LC, as bactérias e fungos isolados, as principais características sociodemográficas e clínicas da população estudada e a análise de sobrevivência dos tempos de epitelização e de cicatrização das lesões relacionados à infecção secundária. Os resultados desse artigo respondem parcialmente os objetivos específicos 1, 2, 3 e 4.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



**Effect of secondary infection on the time of epithelialization
and of total healing of cutaneous leishmaniasis lesions**

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID	MIOC-2016-0557.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Antonio, Liliane; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p> <p>Lyra, Marcelo; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p> <p>Saheki, Maurício; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p> <p>Schubach, Armando; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p> <p>Miranda, Luciana ; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p> <p>Madeira, Maria de Fátima; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p> <p>Lourenço, Maria Cristina; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Bacteriologia</p> <p>Fagundes, Aline; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p> <p>Ribeiro, Érica Aparecida; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Bacteriologia</p> <p>Barreto, Leonardo; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Bacteriologia</p> <p>Pimentel, Maria Ines; Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses</p>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Keyword:	Cutaneous leishmaniasis, Wound infection, Opportunistic infection
Theme:	Leishmaniasis, Evolution, Parasitology, Infectious Disease

SCHOLARONE™
Manuscripts

For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Original article

Running title: Secondary infection leishmaniasis ulcer

Title: Effect of secondary infection on the time for epithelialization and for total healing of cutaneous leishmaniasis lesions

Authors:

Liliane de Fátima Antonio^{a*}

Marcelo Rosandiski Lyra^a

Maurício Naoto Saheki^a

Armando de Oliveira Schubach^{acd}

Luciana de Freitas Campos Miranda^a

Maria de Fátima Madeira^{ace}

Maria Cristina da Silva Lourenço^b

Aline Fagundes^a

Érica Aparecida dos Santos Ribeiro^b

Leonardo Barreto^b

Maria Inês Fernandes Pimentel^a

^aLaboratório de Pesquisa Clínica Clínica e Vigilância em Leishmanioses. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^bLaboratório de Bacteriologia. Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

^cFellow researcher of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

(CNPq) : Brazil;

^dFellow researcher (“Cientista do Nosso Estado”) of Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ): Brazil

^eFellow researcher (“Jovem Cientista do Nosso Estado”) of Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ): Brazil

***Corresponding author:** Liliane de Fátima Antonio

Av Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro/RJ – Brasil CEP 21040:360.

Tel: (0xx21) 38659541; Fax: (0xx21) 38659541.

Email-address: lilianedefatima@gmail.com

Abstract:

BACKGROUND: Cutaneous leishmaniasis (CL) usually presents with single or a few localized cutaneous ulcers, without involvement of mucous membranes. Ulcerated lesions are susceptible to secondary contamination that could slow the healing process.

OBJECTIVE: To verify the influence of non-parasitic wound infection on wound closure (epithelialization and total healing). METHODS: Twenty-five patients with a confirmed diagnosis of CL and ulcerated lesions were submitted to biopsy of the border of the ulcers. One direct microbial (germ identification in cultures) and four indirect clinical (secretion, pain, burning sensation, pruritus) parameters were used. FINDINGS: Biopsies of ten lesions showed secondary infection by one or two microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* and *Candida parapsilosis*). “Secretion” and “burning sensation” influenced the time for epithelialization but not for total healing. Positive detection of germs in the ulcer border as well as “pain” and “pruritus” revealed no

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

influence on wound closure. CONCLUSIONS: Our borderline proof of clinical CL ulcer infection inhibiting CL wound healing underlines the need to follow the antimicrobial stewardship in CL ulcers management as recently postulated for all chronic wounds.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis, Wound infection, Opportunistic infection

Sponsorship

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is endemic in the State of Rio de Janeiro (RJ), Brazil, with 548 confirmed cases between 2007 and 2015 (Brazilian Ministry of Health 2016). Transmission occurs through the bite of sandflies infected by parasites of the genus *Leishmania* (Brazilian Ministry of Health 2013).

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main causative species of CL in RJ (Marzochi & Marzochi 1994). It typically presents with painless ulcerated skin lesions. In general, a single or a few ulcers occur in areas of the skin exposed to insect bites and display rounded or oval shape, infiltrated base, well delimited and raised erythematous borders, reddish background with gross granulations and little secretion (Oliveira-Neto et al. 1997, Brazilian Ministry of Health 2013). The most commonly used treatment is

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

meglumine antimoniate. The mean epithelialization time of the lesions after treatment varies between 30 and 60 days (Oliveira-Neto et al. 1997, Schubach et al. 2005).

The presence of bacterial secondary infection can cause local pain and it leads to serous and purulent exudate; it completely or partially recovers the ulcer fund when drying into crusts (Pessoa & Barreto 1948, Brazilian Ministry of Health 2013), and it may interfere with the healing process (Navarro et al. 2009, Sadeghian et al. 2011).

The incidence of secondary infection in cutaneous leishmaniasis lesions may range from 23.6 to 81% (Vera et al. 2001, Gonçalves et al. 2009, Sadeghian et al. 2011). The most frequently isolated bacteria from cutaneous lesions of leishmaniasis by several methods are *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Corynebacterium diphtheriae* (Vera et al. 2001, Gonçalves et al. 2009, Navarro et al. 2009, Sadeghian et al. 2011).

Navarro et al. (2009), in Venezuela, recommended the use of an antibiotic associated with meglumine antimoniate for the treatment of CL. Sadeghian et al. (2011) observed that the therapeutic effect of meglumine antimoniate was decreased in cutaneous lesions with secondary bacterial infection. These authors have suggested that CL lesions must be evaluated for bacterial infection prior to retreatment in cases of non-response to the specific treatment. However, Vera et al. (2001) observed no influence of secondary bacterial infection, restricted to the ulcer, in the complete re-epithelialization process of CL lesions.

We aimed to verify if the occurrence of secondary infection by bacteria or fungi in the ulcers of CL could influence the time for wound closure (epithelialization and total healing).

Material and methods

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

This was a prospective cohort study of patients with a confirmed diagnosis of localized CL, with ulcerated lesions, treated at the Laboratory of Clinical Research and Surveillance in Leishmaniases, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI), Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), RJ, Brazil, between October 2013 and February 2016.

We excluded patients with more than five skin lesions, those not submitted to biopsy at INI, those who did not sign an informed consent form, and pregnant women. The parasitological diagnosis of CL was established by direct smear examination, and / or culture, polymerase chain reaction (PCR) or histopathological examination of lesion fragments, with visualization or isolation of the protozoan or its DNA.

We collected information on co-morbidities and on systemic and / or topical antibiotic therapy and / or antifungal therapy in the 30 days prior to the biopsy procedure during the diagnostic investigation phase. Patients with more than one cutaneous lesion had their largest or most infiltrated lesion selected. Biopsy procedures included asepsis of the lesion with 70° ethyl alcohol solution, local anesthesia with 2% lidocaine without a vasoconstrictor, and incision of the lesion border with a scalpel or "punch" of 5 to 6 mm in diameter. The cutaneous sample was divided into six fragments and each one was sent, respectively, for the following tests: histopathological analysis; culture, PCR and immunohistochemistry for *Leishmania* (Fagundes et al. 2010, Almeida et al. 2011, Quintella et al. 2012); culture for bacteria; culture for fungi.

The fragments destined to the cultures for bacteria were placed in a sterile flask for transportation containing 0.9% NaCl solution. They were subsequently sent for growth and identification of aerobic and / or facultative anaerobic bacteria and mycobacteria as follows. The fragments were macerated and inoculated into the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

following culture media: blood agar with 5% of Columbia Agar Base defibrinated sheep blood (Merck, Darmstadt, Germany); chocolate agar supplemented with factor V and X (Merck, Darmstadt, Germany), agar brovacin (Merck, Darmstadt, Germany), and thioglycollate medium (Merck, Darmstadt, Germany). We performed conventional biochemical methods for the identification of the bacterial species (Garcia & Isenberg, 2007) and automated analysis in Vitek 2 Compact equipment (BioMerieux Inc, Durhan NC, USA) according to the manufacturer's specification. Culture for mycobacteria was performed in Lowenstein-Jensen medium and by automated culture with the BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System. We interpreted sensitivity tests using the criteria displayed in the M100-S24 document (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013, 2014 and 2015).

For the isolation of fungi the fragments were cultured on Sabouraud dextrose agar media (SDA) and Mycosel agar (Myc) at 25°C up to four weeks. We identified filamentous fungi according to their morphology, and yeasts were identified by automated biochemical methods in the Vitek 2 Compact equipment (BioMerieux Inc, Durhan NC, USA).

All patients were treated with meglumine antimoniate. Nine patients received successful subcutaneous therapy with this medication, one to three injections each 20 days according to the protocol for intralesional treatment in our institution (Duque et al. 2016). Fifteen patients were treated with intramuscular 5 mg of antimony per kilogram per day during 30 days, the standard systemic treatment in our institution (Schubach et al. 2005), and one patient received intramuscular 20 mg of antimony/kg/day during 20 days (Brazilian Ministry of Health recommendation for treatment of CL patients). The choice of the treatment scheme was made by the attending physicians according to their experience in this reference center and to the agreement of the patients. (Oliveira-Neto et al. 1997, Schubach et al. 2005, Vasconcellos et al. 2010a, 2010b, Duque et al. 2016).

1
2
3
4 We evaluated lesions according to the following characteristics: lesion area (<
5 700 mm², > 700 mm²), evolution time (< 60 days, > 60 days), presence of secondary
6 infection prior to antimonial treatment, and response to treatment with epithelialization
7 and with total healing.
8
9

10
11
12 The area of the lesion was determined using the ellipse area formula, which
13 resembles the typical shape of CL lesions (transverse diameter / 2) X (longitudinal
14 diameter / 2) X π (Silva 2014). We measured the diameter of the lesion with a
15 transparent ruler, using the external margins of the lesion border (Oliveira-Neto et al.
16 1997).
17
18

19 We defined secondary infection as the isolation of bacteria or fungi from a
20 cultured lesion fragment. Additionally, we evaluated the following signs and symptoms
21 suggestive of secondary infection: secretion, pain, burning sensation and pruritus.
22
23

24 We defined epithelialization as a lesion that no longer presented with erosion
25 and crusting. However, at this stage, it could present with desquamation, infiltration and
26 / or erythema. We evaluated epithelialization at medical appointments every 10 to 20
27 days from the start of treatment. The patients were followed up after epithelialization at
28 one, two, three, six, nine and twelve months to evaluate the progression to total wound
29 healing. We defined total healing or resolution of the lesion as an epithelialized lesion
30 without desquamation and infiltration, and with or without slight residual erythema.
31
32

33 We analyzed the association of the occurrence of secondary infection with the
34 categorical variables through the Fisher's exact test. We evaluated the continuous
35 variables (rejected by the Shapiro-Wilk normality test) using the Mann-Whitney non-
36 parametric test. The exploratory survival analysis until the time of epithelialization and
37 of total healing, both stratified by the occurrence of secondary infection and signs and
38 symptoms suggestive of secondary infection, was performed by the Kaplan-Meier
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 method. We censored patients who abandoned post-treatment follow-up at their last
4
5 visit. The Log-Rank test indicated significant survival curves at the 5% level.
6

7 Analyzes were performed using the softwares R version 3.0 R Core Team (2014)
8
9 and Statistical Package for the Social Sciences version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL,
10
11 USA). We used a significance level of 5% in all statistical tests.
12

13
14 This study was approved at INI / Fiocruz Research Ethics Committee under
15
16 number CAAE 19704113.0.0000.5262.
17

18 19 20 Results

21
22
23
24
25 We included 25 patients with CL, with ages varying from nine to 76 years
26
27 (median of 31 years), being 84% men. Patients had one to five lesions, and 15 of them
28
29 had a single lesion. There was no influence of the number of lesions in the time for the
30
31 occurrence of epithelialization or of total healing. Thirteen presented lesions in lower
32
33 limbs, seven in upper limbs, four in trunk and one in head and neck.
34

35
36 All patients had confirmed parasitological diagnosis. In 20 of the patients (80%)
37
38 amastigotes were visualized by culture and in 14 (56%) by histochemical or
39
40 immunohistochemical analysis of fragments of the lesions. Identification of the parasite
41
42 was performed in eight cases, all of them *Leishmania (Viannia) braziliensis*.
43

44
45 The median time of evolution of the lesions at the first visit was 60 days, ranging
46
47 from 15 to 330 days. The lesion area varied from 94 to 10,387 mm² (median 942 mm²).
48
49 Some of the signs and symptoms suggestive of secondary infection were observed in
50
51 80% of the patients (60% presented with secretion, 44% with pain, 44% with pruritus,
52
53 and 40% with burning sensation). Five patients had some co-morbidities such as arterial
54
55 hypertension, anemia, chronic obstructive pulmonary disease, alcoholism, diabetes
56
57
58
59
60

1
2
3 mellitus.
4

5 Systemic and / or topical antibiotics prior to the biopsy were used by 88% (n =
6 22) of the patients and 12% (n = 3) used systemic and / or topical antifungal. The most
7 commonly used systemic antibiotic was cephalexin, followed by amoxicillin and
8 sulfamethoxazole + trimethoprim, either alone or in combination with other systemic or
9 topical antibiotics. Seven patients used topical neomycin + bacitracin, one used
10 mupirocin and one used rifampicin. Some patients were unable to specify the topical
11 antibiotics used. The other systemic antibiotics reported by the patients were
12 clindamycin, benzathine penicillin, ciprofloxacin, norfloxacin, tetracycline. The used
13 antifungals were oral itraconazole, topical miconazole and topical ketoconazole.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 Secondary infection of the lesion was found in 40% (n = 10) of the patients. The
25 most frequently isolated bacterium was *Staphylococcus aureus*. All of these patients had
26 at least one sign or symptom suggestive of secondary infection and most of them had
27 used previous antibiotic therapy. Most isolates of *Staphylococcus aureus* presented
28 resistance profile to several antibiotics. Three patients did not use antibiotics or did not
29 remember the substances, and four used antibiotics that were not appropriate for the
30 subsequently isolated bacteria. Only one of the isolated Gram positive bacteria was
31 sensitive to the previously used antibiotic. The isolated Gram negative bacteria did not
32 demonstrate resistance to the standard antibiotics. Two patients had *Candida*
33 *parapsilosis* isolated (Table 1).
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 The occurrence of secretion, burning sensation and / or pruritus was more
48 frequent when secondary infection was present, however only the burning sensation was
49 statistically significant (Table 2).
50
51
52
53

54 All patients presented epithelialization of the lesions. Time for epithelialization
55 varied between 9 and 124 days, with a median of 51 days. One patient, who had
56
57
58
59
60

1
2
3 abandoned follow-up prior to epithelialization, returned to the medical appointment
4
5 after one year with the lesion totally healed.
6

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
There was no difference in epithelialization time between patients with and without secondary infection. However, lesions with secretion or burning sensation took longer to epithelialize than lesions from patients without these characteristics (Table 3).

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Twenty-one patients (72%) presented total healing of the lesions, and the time to achieve it ranged from 26 to 301 days (median of 173 days). The remaining four patients discontinued follow-up. However, these patients were rescued after one year of treatment, when their lesions were totally healed.

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
There was no significant difference in the time required for total healing of the lesions of patients with secondary infection when compared to those without infection. None of the signs and symptoms indicative of secondary infection influenced the time to the occurrence of total healing of the CL lesions (Table 4).

34 Discussion

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
This study investigated the occurrence of secondary infection and of signs and symptoms suggestive of this infection, and their influence on the time for epithelialization and for total healing of the lesions of patients with CL. The majority of the studied population were young male adults with a single cutaneous lesion located mainly in the lower limbs, as observed in previous studies (Schubach et al. 2005, Romero et al. 2016).

52
53
54
55
56
57
58
59
60
CL is a disease that depends on the exposure to the sand fly vector, which is fundamentally an inhabitant of the forests. However, in endemic areas of ancient colonization in Brazil, like the state of RJ, the sand flies have adapted to the

1
2
3 environment around human habitation, reaching any age in these areas. This explains
4
5 why we found patients of different age groups, but with greater involvement of adults,
6
7 who are also exposed during outdoor activities. The predominance in the male gender
8
9 reflects the greater exposure of men to the bite of the vectors in certain professional
10
11 activities, such as among soldiers sent to training in the jungle (Brazilian Ministry of
12
13 Health 2013).
14
15

16
17 The occurrence of secondary infection in the lesions of the studied patients was
18
19 similar to that reported in previous studies (Vera et al. 2001, Gonçalves et al. 2009,
20
21 Sadeghian et al. 2011, Doudi et al. 2012). Patients with ulcerated CL lesions are subject
22
23 to secondary infection. Salgado et al. (2016) suggested that the inflammation promoted
24
25 by the presence of *Leishmania* parasites and triggered by the innate immune system can
26
27 generate an environment suitable for the development of some commensal bacteria
28
29 whereas hindering the development of less adapted others.
30
31

32
33 Chronic wound infection hampers healing process, particularly if biofilms are
34
35 formed, because they reduce germ elimination by antimicrobials or the innate and
36
37 adaptive host immune response (Høiby et al. 2015, Vyas & Wong 2016). However, the
38
39 analysis of biofilms in CL-specific lesions was not the subject of this study. The use of
40
41 non-specific treatments such as physical wound debridement that would destroy
42
43 biofilms are not considered an ethical choice in the New World, due to the not
44
45 negligible risk of mucosal leishmaniasis. The first choice for specific treatment in the
46
47 CL of the New World is the therapy with pentavalent antimonials, but the dosage and
48
49 route of administration must be evaluated according to the risk-benefit for each patient
50
51 (WHO 2010).
52
53

54
55 There was isolation of two bacteria in the same lesion in only one studied
56
57 patient. Fontes et al. (2005) also observed contaminations of the cutaneous lesions by a
58
59
60

1
2
3 single microorganism in most cases. The competition environment among the most
4
5 adaptable bacteria could explain the small diversity of the isolated microorganisms
6
7 (Salgado et al., 2016). Another explanation for the absence of microorganisms diversity
8
9 in the studied lesions is the **method** used to collect the sample, added to the asepsis of
10
11 the lesion before the collection of the biopsy fragment. We aimed to reduce the isolation
12
13 of microorganisms that were only colonizing the superficial layer of the lesions. In
14
15 previous studies in which lesion cleansing was performed with saline solution, and
16
17 sample collection was performed with a swab, a greater diversity of microorganisms
18
19 was observed (Gonçalves et al. 2009, Salgado et al. 2016).
20
21

22
23 The negativity of the cultures and the low diversity of **the** isolated bacteria in the
24
25 cutaneous lesions in this study could be also related to the previous use of antibiotic
26
27 therapy (Navarro et al. 2009). It is reasonable to suppose that the use of previous
28
29 antibiotic therapy has influenced the isolation of bacteria (Fontes et al. 2005, Vera et al.
30
31 2006, Gonçalves et al. 2009, Yeboach-Manu et al. 2013). However, we were not able to
32
33 state that the previous used **antibiotics were the right ones** or if **they were** used correctly
34
35 or not, since **their** use was prior to the medical **care** at INI. Data on previous antibiotic
36
37 therapy were obtained from the patients' reports, and it was not possible to be sure of the
38
39 dosage or the duration of its use.
40
41

42
43 *Staphylococcus aureus* was the most frequently isolated bacterium and it was
44
45 also the most prevalent bacterium in other studies that evaluated the microbiota of
46
47 cutaneous lesions of CL (Fontes et al. 2005, Doudi et al. 2012, Salgado et al. 2016).
48
49 *Staphylococcus aureus* can be found in the normal skin microbiota and ulceration could
50
51 serve as the gateway to the development of the infection. Additionally, this bacterium
52
53 produces enzymes that lyse tissue components thus facilitating invasion (Doudi et al.,
54
55 2012).
56
57
58
59
60

1
2
3 *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* are commensal
4
5 microorganisms that act as opportunistic pathogens (Koneman et al., 2001, Horner et
6
7 al., 2005, Brouwer et al., 2016). *Pseudomonas aeruginosa* infection tends to be
8
9 confined to the skin or its appendages in immunocompetent patients. *Enterococcus*
10
11 *faecalis* is part of the amphibiotic microbiota of the gastrointestinal tract. Contamination
12
13 can occur from person to person or through the consumption of contaminated food or
14
15 water (Facklam et al., 1999). *Streptococcus pyogenes* is often associated with primary
16
17 infections of the pharynx and tonsils and its transmission from person to person is
18
19 through direct contact or secretions (sneezing and coughing) (Brouwer et al. 2016). All
20
21 these bacteria were also isolated from CL lesions in other studies (Vera et al. 2006,
22
23 Shirazi et al. 2007, Ziaei et al. 2008, Gonçalves et al. 2009).

24
25
26
27 In this study, in addition to bacteria, *Candida* sp was isolated from the lesions of
28
29 CL in a lower proportion as also observed by Fontes et al. (2005). The isolation of this
30
31 fungus, which is part of the human microbiota, is a reflection of its opportunistic nature
32
33 (Kashem and Kaplan 2016).

34
35
36 A limitation of the study was the fact that the biopsies were performed at the
37
38 border of the lesions, as indicated for the parasitological confirmation of CL. A biopsy
39
40 sample from the base of the debrided ulcer is recommended by the European Society of
41
42 Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guideline when moderate to
43
44 severe soft tissue infection is suspected in chronic wounds (Høiby et al. 2015).
45
46 However, this is not established as a routine procedure for CL management in Brazil.
47
48 The use of cleansing methods at the biopsy sites may also influence the results of the
49
50 microbiological studies (Schwarzkopf & Dissemond 2015). Another weakness of the
51
52 study was the small number of allocated patients, reflecting the decrease in CL cases in
53
54 Brazil over the last years. Additionally, the number of patients with secondary infection
55
56
57
58
59
60

1
2
3 made it difficult to verify the influence of each microorganism in the time for the
4
5 occurrence of epithelialization and of total healing through survival analysis.
6

7
8 The presence of secondary infection did not influence the time for epithelialization or
9
10 for the total healing of the lesions. However, most patients with secondary infection
11 presented with secretion and reported burning sensation, both associated with a longer time
12
13 of epithelialization. The presence of purulent secretion is suggestive of infection in the
14
15 ulcerated lesions (Landis 2008, Lipsky & Hoey 2009, Fierheller & Sibbald 2010). Large
16
17 and purulent lesions tend to have higher positivity in fungal or bacterial cultures (Fontes
18
19 et al. 2005). "Burning sensation" is essentially due to chronic inflammation in reaction
20
21 to biofilms. Consequently, this categorical variable was represented significantly more
22
23 often when there was isolation of microorganisms in the CL ulcers. These two indirect
24
25 clinical parameters of wound infection (secretion, burning sensation) were better
26
27 indicators of wound healing impairment than the isolation of microorganisms as well as
28
29 pain and pruritus. The clinical wound infection markers "pain" and "pruritus" are
30
31 probably modified by altered nociceptive signals in the course of CL (Borghi et al.
32
33 2017).
34
35
36
37

38
39 Our borderline proof of clinically infected CL lesions inhibiting wound healing
40
41 support infection prevention by wound hygiene and antiseptics with only narrowly
42
43 focused systemic and topic antibiosis in the treatment of ulcerated lesions of CL
44
45 respecting antimicrobial stewardship (Lipsky et al. 2016) recently advocated for all
46
47 chronic wounds (O'Donnell & Guarascio 2017).
48
49
50
51
52

53
54 Acknowledgements
55
56
57
58
59
60

1
2
3 We thank Ginelza Peres Lima dos Santos, Michele Aparecida Ferreira Moreira de
4
5 Oliveira, Cleuma da Silva and Tatiana Cristina Vieira de Carvalho for the
6
7 administrative support. We also thank Claudia Maria Valete-Rosalino, Benivaldo
8
9 Ramos Ferreira Terceiro and Frederico Pereira Bom Braga for the ear, nose and throat
10
11 evaluation of the patients, as well as Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira for
12
13 the statistical support.
14
15
16
17
18
19

20 References

- 21
22
23 Almeida ABPF, Souza VRF, Sorte ECB, Figueiredo FB, Paula DAJ, Pimentel MFA, et
24
25 al. Use of parasitological culture to detect Leishmania (Leishmania) chagasi in
26
27 naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:1555-60.
- 28 Borghi SM, Fattori V, Conchon-Costa I, Pinge-Filho P, Pavanelli WR, Verri WA Jr.
29
30 Leishmania infection: painful or painless? *Parasitol Res* 2017; 116(2):465-475.
- 31 Brazil. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância em Saúde - Sistema de Informação
32
33 de Agravos de Notificação - Sinan Net Leishmaniose Tegumentar Americana -
34
35 Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de
36
37 Notificação - Rio de Janeiro. Access in September 29, 2016. Available at:
38
39 <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltarj.def>
- 40 Brazil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da
41
42 Leishmaniose Tegumentar Americana. 2a edição atualizada. Brasília, DF: O
43
44 Ministério; 2013.
- 45 Brouwer S, Barnett TC, Rivera-Hernandez T, Rohde M, Walker MJ. Streptococcus
46
47 pyogenes adhesion and colonization. *FEBS Lett* 2016;[online].
- 48 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial
49
50 Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document
51
52 M100-S24 (ISBN 1-56238-897-5 [Print]; ISBN 1-56238-898-3 [Electronic]).
53
54 Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500,
55
56 Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013, 2014, 2015.
- 57 Doudi M, Setorki M, Narimani M. Bacterial superinfection in zoonotic cutaneous
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- leishmaniasis. *Med Sci Monit* 2012; 18(9):BR356-61.
- Duque MCO, Vasconcellos ECF, Pimentel MIF, Lyra MR, Bedoya-Pacheco SJ, Marzochi MCA, et al. Standardization of the technique for the treatment of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate via the intralesional route. *Rev Soc Bras Med Trop* [in press]
- Facklam RR, Sahn DF, Teixeira LM. Enterococcus. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Ed 7th. 1999 : 297-303.
- Fagundes A, Schubach AO, De Paula CC, Bogio A, Antonio LA, Schiavoni P, et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105:109-12.
- Fierheller M, Sibbald RG. A clinical investigation into the relationship between increased periwound skin temperature and local wound infection in patients with chronic leg ulcers. *Adv Skin Wound Care*. 2010 Aug;23(8):369-79; quiz 380-1.
- Fontes CO, Carvalho MAR, Nicoli JR, Hamdan JS, Mayrink W, Genaro O, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of micro-organisms recovered from cutaneous lesions of human American tegumentary leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *J Med Microbiol* 2005; 54(11):1071-6.
- Garcia LS & Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd ed. update. Washington, DC: ASM Press, c2007.
- Gonçalves EGR, Reis Filho SA, Oliveira EG, Pareira ALN, Silva AR, Costa JML. Infecção bacteriana na leishmaniose cutânea: padrão bacteriano e sensibilidade a antibióticos. *Ver Soc Bras Med Trop*. 2009; 42(2):219-21.
- Høiby N, Bjarsholt T, Moser C, Bassi GL, Coenye T, Donelli G, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21(suplemento1):S1-S25.
- Hörner R, Liscano MGH, Maraschin MM, Salla A, Meneghetti B, Dal Forno NLF, et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de Enterococcus isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria. *J Bras Patol Med Lab* 2005;41(6):391-5.
- Kashem SW, Kaplan DH. Skin Immunity to Candida albicans. *Trends Immunol*. 2016 Jul;37(7):440-50.
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC, *Diagnóstico Microbiológico* 5ª Ed. Medsi, São Paulo, 2001.
- Landis SJ. Chronic wound infection and antimicrobial use. *Adv Skin Wound Care*.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 2008; 21(11):531-40; quiz 541-2.
- Lipsky BA, Hoey C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. Clin Infect Dis. 2009 15;49(10):1541-9. Review
- Lipsky BA, Dryden M, Gottrup F, Nathwani D, Seaton RA, Stryja J. Position Paper from the British Society for Antimicrobial Chemotherapy and European Wound Management Association. J Antimicrob Chemother 2016; 71(11):3026-35.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. Cad Saúde Públ. 1994; 10(supl. 2):359-75.
- Navarro P, Silva S, De La Parte MA, Colmenares LA, Coraspe V, Garrido E, et al. Utilidad del cefadroxilo en leishmaniosis tegumentaria americana coinfecciones piógenas sobreagregadas. Kasmera. 2009; 32(2):131-9.
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). Am J Trop Med Hyg. 1997; 57(6):651-655.
- O'Donnell LA, Guarascio AJ. The intersection of antimicrobial stewardship and microbiology: educating the next generation of health care professionals. FEMS Microbiol Lett 2017; 364(1).
- Pessoa S, Barreto M. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação; 1948.
- Quintella LP, Passos SRL, Miranda LHM, Cuzzi T, Valle ACF, Galhardo MCG, et al. Proposal of a histopathological rule for the differential diagnosis between American tegumentar leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. Br J Dermatol. 2012; 167:837-46.
- Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. Am J trop Med Hyg 2001; 65(5):456-65.
- Sadeghian G, Ziaei H, Bidabadi LS, Baghbaderani AZ. Indian Journal of Dermatology. 2011; 56(1):37-9.
- Salgado VR, Queiroz ATL, Sanabani SS, Oliveira CI, Carvalho EM, Costa JML, et al. The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. Mem Inst Oswaldo Cruz

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 2016; 111(4):241-51.
- Schubach A de O, Marzochi KBF, Moreira JS, Schubach TMP, Araújo ML, Vale ACF do, et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38(3):213-7.
- Schwarzkopf A, Dissemond J. Indications and practical implementation of microbiologic diagnostics in patients with chronic wounds. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015; 13(3):203-9.
- Shirazi MH, Ranjbar r, Asgari V, Mohebalı M, Hamidian M. Study of bacterial infections among the patients with suspected cutaneous leishmaniasis. *Pak. J. Biol. Sci.* 2007; 10(24):4555-8.
- Silva J P. Como calcular a área e o perímetro de uma elipse? 2014 [Online] Acessado em 20 de outubro 2016. Disponível em: http://www2.fc.unesp.br/revistacqd/v3n1/v3n1_art1.pdf
- Vasconcellos ECF, Pimentel MIF, Valetе-Rosalino CM, Lyra MR, Salgueiro MM, Saheki MN, et al. Efetividade e segurança do antimoniate de meglumina intralesional no tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana forma cutânea. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2010a; 43(suplementoII):52-5.
- Vasconcellos ECF, Schubach AO, Valetе-Rosalino CM, Coutinho RS, Conceição-Silva F, Salgueiro MM, et al. American tegumentary leishmaniasis in older adults: 44 cases treated with an intermittent low-dose antimonial schedule in Rio de Janeiro, Brazil. *J Am Geriatr Soc* 2010b; 58(3):614-5.
- Vera LA, Santos JB, Macêdo VO, Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34(3):233-7.
- Vera LA, Macedo VO, Magalhães AV, Ciuffo IA, Santos CG, Santos JB. Úlceras leishmanióticas cutâneas com presença de *Corynebacterium diphtheriae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(4):311-3.
- Vera LA, Macedo JL, Ciuffo IA, Santos CG, Santos JB. Antimicrobial susceptibility of aerobic bacteria isolated from leishmaniotic ulcers in Corte de Pedra, BA. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(1):47-50.
- Vyas KS, Wong LK. Detection of Biofilm in Wounds as an Early Indicator for Risk for Tissue Infection and Wound Chronicity *Ann Plast Surg* 2016; 76(1):127-31
- World Health Organization. WHO Technical Report Series 949. Control of the leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

of Leishmaniasis. Geneva, 22-26 March 2010. Access in September 29, 2016.

Available at: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf

Yeboah-Manu D, Kpeli GS, Ruf MT, Asan-Ampah K, Quenin-Fosu K, Owusu-Mireku E, et al. Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(5):e2191.

Ziaei H, Sadeghian G, Hejazi SH. Distribution frequency of pathogenic bacteria isolated from cutaneous leishmaniasis lesions. *Korean J Parasitol.* 2008; 46(3):191-3.

Table 1: Isolated microorganism, antibiotic therapy in the 30 days previously to the skin biopsy, and signs and symptoms suggestive of secondary infection observed in ten patients with cutaneous leishmaniasis lesions in Rio de Janeiro between 2013 and 2016.

Patient	Isolated microorganisms	Antibiotic therapy (30 previous days)	Signs and symptoms suggestive of secondary infection	Resistance to tested antibiotics
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	Pain, burning sensation and pruritus	CL, ER, GE, PE
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	Pruritus	CL, ER, GE, PE
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CL, CE	Secretion, pain and pruritus	NR
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	S+T, N+B	Secretion, pain and burning sensation	NR
5	<i>Enterococcus faecalis</i>	CE, N+B	Secretion and burning sensation	CI, RI, TE, LE, ST
6*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AM	Secretion and burning sensation	NR
7	<i>Candida parapsilosis</i>	S+T, N+B	Secretion	Not A
8	<i>Staphylococcus aureus</i>	AM	Secretion, burning sensation and pruritus	PE
9	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>	NA	Burning sensation and pruritus	PE, TE ASTNR
10	<i>Candida parapsilosis</i>	NA	Secretion, burning sensation and pruritus	Not A

* Patient used itraconazole. Other patients did not use antifungals for the 30 days before the biopsy. CL-clindamycin; CE - cephalixin; S + T - sulfamethoxazole + trimethoprim; N + B - neomycin + bacitracin; AM-amoxicillin; ER - erythromycin; GE-gentamycin; CI-ciprofloxacin; RI - rifampicin; TE-tetracycline; LE-levofloxacin; PE - penicillin; ST -streptomycin; NI – patient did not inform; NA – patient did not use antibiotic; NR - no resistance; ASTNR - antibiotic sensitivity test not recommended; Not A – not applicable.

Table 2: Analysis of categorical variables according to the occurrence of secondary infection in patients with cutaneous leishmaniasis treated in Rio de Janeiro between 2013 and 2016.

Variables	Secondary infection		<i>p</i> -value	
	Yes (N=10) n (%)	No (N=15) n(%)		
Gender	Men	8	13	1.000
	Women	2	2	
Age	≤ 18 years	2	2	1.000
	> 18 years	8	13	
Secretion	Yes	7	8	0.678
	No	3	7	
Pain	Yes	3	8	0.414
	No	7	7	
Burning sensation	Yes	7	3	0.034
	No	3	12	
Pruritus	Yes	6	5	0.241
	No	4	10	
Number of lesions	One lesion	6	9	1.000
	≥ two lesions	4	6	
Area of the lesion	≤ 700 mm ²	4	7	1.000
	> 700 mm ²	6	8	
Time of evolution of the lesions	≤ 60 days	4	10	0.241
	> 60 days	6	5	
Co-morbidities	Yes	2	3	1.000
	No	8	12	
Lesion location	Lower limbs	6	7	0.688
	Other locations	4	8	

Bold, significant *p*-value.

Table 3: Kaplan-Meier analysis of the time observed until epithelialization of the lesions of 25 patients with cutaneous leishmaniasis treated in Rio de Janeiro between 2013 and 2016.

Variable		n (%)	Time for epithelialization (days)	Log Rank
			Median (Quartile 70;90)	p-value
Secondary infection	presence	10 (40)	54 (71;123)	0.395
	absence	15 (60)	49 (89;117)	
Secretion	presence	15 (60)	63 (96;121)	0.023
	absence	10 (40)	28 (46;98)	
Pain	presence	11 (44)	77 (96;119)	0.522
	absence	14 (56)	39 (54;121)	
Burning sensation	presence	10 (40)	77 (119;124)	0.019
	absence	15 (60)	42 (54;96)	
Pruritus	presence	11 (44)	49 (79;124)	0.975
	absence	14 (56)	55 (77;119)	

Bold, significant p-value.

Table 4: Kaplan-Meier analysis up to the observed time for total healing of the lesions of 25 patients with CL attended in Rio de Janeiro between 2013 and 2016.

Variable		n (%)	Time for total healing (days)	Log Rank
			Median (Quartile 70;90)	p-value
Secondary infection	presence	10 (40)	184 (231;267)	0.292
	absence	15 (60)	161 (182;231)	
Secretion	presence	15 (60)	173 (226;231)	0.781
	absence	10 (40)	182 (231;301)	
Pain	presence	11 (44)	182 (231;233)	0.770
	absence	14 (56)	161 (226;231)	
Burning sensation	presence	10 (40)	156 (196;231)	0.304
	absence	15 (60)	182 (231;233)	
Pruritus	presence	11 (44)	196 (231;301)	0.449
	absence	14 (56)	173 (226;231)	

5 ARTIGO 2: OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO SECUNDÁRIA NAS LESÕES CUTÂNEAS ULCERADAS DA ESPOROTRICOSE E SUA INFLUÊNCIA NO TEMPO DE EPITELIZAÇÃO E CICATRIZAÇÃO TOTAL

OLIVEIRA-ANTONIO, L. F.; LYRA, M. R.; PIMENTEL, M. I. F. et al. Ocorrência de infecção secundária nas lesões cutâneas ulceradas da esporotricose e sua influência no tempo de epitelização e cicatrização total (Em construção)

Esse artigo apresenta a identificação de infecção secundária nas lesões ulceradas de esporotricose e a sua influência no tempo de epitelização e cicatrização das lesões. Também apresenta as bactérias isoladas das lesões estudadas e descreve os tipos de cicatrização apresentados. Os resultados desse artigo finalizam a resposta aos objetivos específicos 1, 2, 3 e 4. Será submetido à revista *Mycology*.

Ocorrência de infecção secundária nas lesões cutâneas ulceradas da esporotricose e sua influência no tempo de epitelação e cicatrização total

Resumo: A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica causada, na maior parte das vezes, por implantação traumática do fungo dimorfo *Sporothrix schenckii*. As lesões ulceradas de esporotricose apresentam frequentemente secreção purulenta. No entanto, referência bibliográfica sobre infecção bacteriana secundária nessas lesões não foi encontrada. Nesse estudo, visamos identificar a ocorrência de infecção secundária nas lesões cutâneas ulceradas da esporotricose e sua influência no tempo de epitelação e cicatrização total. Uma coorte de 64 pacientes com lesões cutâneas ulceradas de esporotricose confirmadas com crescimento do *Sporothrix schenckii* sensu lato em cultura foi atendida no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), entre outubro de 2013 e fevereiro de 2016. Foi analisada a associação da ocorrência de infecção secundária com as variáveis categóricas utilizando o teste exato de Fisher. A análise exploratória de sobrevivência do tempo para ocorrência de epitelação e cicatrização foi realizada pelo método de Kaplan-Meier. Em seis casos houve o isolamento de *Staphylococcus aureus* e em um desses foi também isolado *Enterobacter cloacae*. Lesões com mais de 60 dias de evolução apresentaram associação significativa com a presença de infecção secundária. Infecção secundária ou sinais e sintomas a ela associados não influenciaram no tempo necessário para ocorrência de epitelação e cicatrização total das lesões de esporotricose.

Introdução

A esporotricose é uma micose subaguda ou crônica causada, na maior parte das vezes, por implantação traumática do fungo dimorfo *Sporothrix schenckii*. As lesões costumam ser restritas à pele, tecido celular subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes (BARROS et al, 2011). A doença tem distribuição mundial, com predomínio em áreas tropicais e temperadas (BARROS et al, 2011). No estado do Rio de Janeiro, cerca de 2.344 casos de esporotricose foram notificados entre 2013 e 2016 (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2016a).

A apresentação mais frequente da esporotricose é a forma linfocutânea, que caracteriza-se por formação de nódulo ou placa que tende a ulcerar ou assumir aspecto verrucoso, com surgimento de linfangite e lesões secundárias (nódulos ou gomas) com

características semelhantes à primeira e que seguem o trajeto de vasos linfáticos (RAMOS; SILVA et al, 2007; BARROS et al, 2011). A forma fixa é representada por lesão única no local da inoculação, frequentemente ulcerada e com bordas infiltradas; pode também apresentar-se como lesão vegetante, verrucosa, tuberosa, ou como placa infiltrada, sem envolvimento linfático (BARROS et al, 2011) e algumas vezes circundada por pápulas “satélites” (REIS et al, 2013).

O diagnóstico definitivo de esporotricose é obtido através do isolamento e identificação de *S. schenckii* sensu lato em meios de cultura (BARROS et al, 2011). O tratamento de primeira escolha é o itraconazol, apresentando baixa toxicidade e boa tolerância (KAUFFMAN et al, 2007; BARROS et al, 2011a; 2011b). Nos casos com impossibilidade de utilizar itraconazol, a terbinafina é a droga mais indicada (FRANCESCONI et al, 2009; BARROS et al, 2011b).

As infecções secundárias se desenvolvem em áreas de pele já danificada e a subsequente invasão de áreas circunvizinhas pode agravar e prolongar a doença. Isso pode ocorrer quando a integridade da pele foi quebrada ou o meio imune local é alterado pela condição primária da pele, permitindo a infecção por bactérias (BERGER, 2008; ROSSOLINI; STEFANI, 2009). As lesões ulceradas de esporotricose apresentam frequentemente secreção purulenta. ALMEIDA-PAES et al (2016) destacaram que a biossíntese de melanina, pigmento importantes para a virulência fúngica e sobrevivência no hospedeiro, pode ser reforçada quando o fungo está em contacto com algumas bactérias, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. No entanto, não encontramos outros estudos sobre infecção bacteriana secundária nas úlceras específicas desta enfermidade.

Tendo em vista que o modo principal de inoculação do fungo é por traumas, geralmente com matéria vegetal ou mordedura/arranhadura por gatos, potencialmente carreadores de microrganismos (BUMA et al, 2006), visamos identificar a ocorrência de infecção secundária nas lesões cutâneas ulceradas da esporotricose e sua influência no tempo de epitelização e cicatrização total.

Métodos

Seleção dos pacientes:

Trata-se de um estudo prospectivo, com uma coorte de 64 pacientes com lesões cutâneas ulceradas atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em

Leishmanioses (LapClin VigiLeish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), entre outubro de 2013 e fevereiro de 2016. Gestantes, pacientes com esporotricose na forma cutânea disseminada e pacientes que não fizeram biópsia no INI ou não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido foram excluídos do estudo.

Diagnóstico:

Todos os pacientes incluídos apresentaram confirmação diagnóstica realizada por isolamento do *Sporothrix schenckii* sensu lato em cultura de fragmento de lesão cutânea em meios Sabouraud e Micosel, coletado através de procedimento de biópsia realizada durante a fase de investigação e tratados com itraconazol ou terbinafina. Em pacientes com mais de uma lesão, a maior e mais infiltrada foi selecionada.

Avaliação de infecção secundária:

A biópsia foi realizada com anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor, com retirada de fragmento da borda da lesão através de corte com bisturi ou “punch” de 5 a 6 mm. O fragmento retirado foi dividido e enviado para cultura de fungos, análise histopatológica, cultura, PCR e imunohistoquímica para *Leishmania* (Fagundes et al. 2010, Almeida et al. 2011, Quintela et al. 2012, Antonio et al, 2016) e cultura de bactérias aeróbicas e/ou anaeróbicas facultativas, e micobactérias. Para o isolamento de bactérias, o tecido foi macerado e inoculado em um dos seguintes meios de cultura: agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado Columbia Agar Base (Merck, Darmstadt, Germany); agar chocolate suplementado com fator V e X (Merck, Darmstadt, Germany), agar brolacin (Merck, Darmstadt, Germany), e o meio de tioglicolato (Merck, Darmstadt, Germany). Para identificação da espécie bacteriana foram utilizados métodos bioquímicos convencionais (Garcia & Isenberg, 2007) e análise automatizada no equipamento Vitek 2 Compact (BioMerieux Inc, Durhan NC, USA), de acordo com a especificação do fabricante. O cultivo de micobactérias foi realizado em meio Lowenstein-Jensen e por cultura automatizada com o BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System. Os testes de sensibilidade foram interpretados utilizando os critérios estabelecidos no documento M100-S24 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2013, 2014 e 2015).

Avaliação clínica:

Os pacientes foram submetidos a avaliação clínica de suas lesões cutâneas, antes,

durante, e após o tratamento, sendo acompanhados até a resolução da enfermidade, num intervalo de aproximadamente 30 dias entre as consultas, com medida dos diâmetros interno e externo das bordas das lesões ulceradas. A área da lesão ulcerada foi determinada utilizando a fórmula da área da elipse: $(\text{diâmetro transversal} / 2) \times (\text{diâmetro longitudinal} / 2) \times \pi$.

A epitelização foi definida como fechamento da úlcera através de neoformação epidérmica que ocluiu totalmente a superfície da úlcera, podendo ainda apresentar descamação, infiltração e eritema. A cicatrização definitiva, que caracterizou a resolução da lesão, foi definida como epitelização da lesão e ausência de crostas, descamação, infiltração, podendo ou não apresentar eritema residual leve.

Análise de dados:

Foi avaliada a frequência simples das variáveis categóricas, e mediana, mínimo e máximo das variáveis contínuas. A associação da ocorrência de infecção secundária com as variáveis categóricas foi analisada utilizando o teste exato de Fisher. A análise exploratória de sobrevivência foi realizada pelo método de Kaplan-Meier para cada um dos desfechos considerando o tempo de epitelização e tempo de cicatrização. Pacientes que abandonaram o seguimento do estudo pós-tratamento foram censurados. Os testes de Log-Rank indicaram curvas de sobrevivência significativas ao nível de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se os softwares R versão 3.0 e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 16.

Resultados

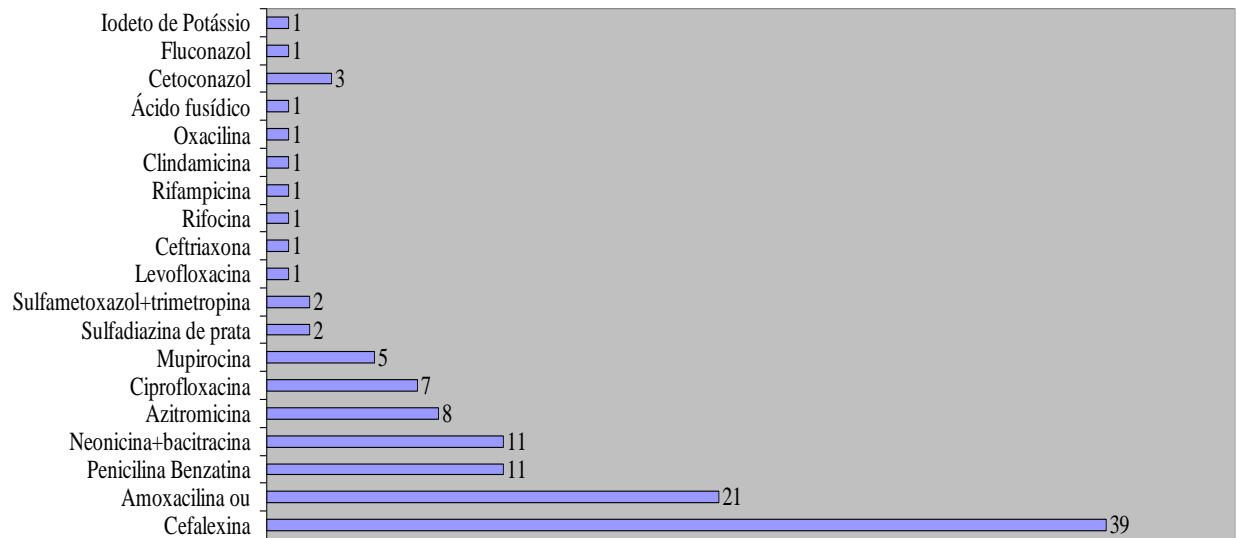
Dos 64 pacientes incluídos com esporotricose, 43 eram mulheres e 21 homens, com idade variando de 6 a 80 anos e mediana de 24 anos. Quarenta e três (67%) pacientes apresentavam a forma linfocutânea e 21 (33%) apresentavam a forma fixa. A área provável de infecção de todos os casos foi o estado do Rio de Janeiro. Trinta e três pacientes apresentaram lesões em membros superiores, 13 no tronco, 12 em membros inferiores e 6 em cabeça e pescoço.

O tratamento de 62 pacientes foi realizado com itraconazol e de 2 com terbinafina. Dezesesseis pacientes (25%) apresentavam co-morbidades como: hipertensão, miomatose, doença de Crohn, depressão, arritmia cardíaca, diabetes mellitus, hipotireoidismo e lúpus.

Cinquenta e sete pacientes (89%) fizeram uso de antibiótico sistêmico e/ou local e quatro pacientes fizeram uso de antifúngico previamente à investigação diagnóstica. Desses

38 pacientes utilizaram mais de um antibiótico/antifúngico concomitantemente. Os antibióticos e antifúngicos usados foram listados no figura 1.

Figura 1: Número de pacientes por antibióticos e antifúngicos utilizados.



Foram isolados dois microorganismos em 6 lesões de esporotricose: *Staphylococcus aureus* em todas as lesões, *Enterobacter cloacae* em uma lesão (tabela 1). Todos os pacientes apresentaram resultados negativos na pesquisa de micobactérias e *Leishmania sp* nos respectivos meios de cultura..

Tabela 1: Descrição da antibioticoterapia usada e sinais e sintomas sugestivos de infecção secundária observados nos seis pacientes com infecção secundária em lesões de esporotricose atendidos no Rio de Janeiro entre 2013 e 2016.

Paciente	Microorganismos isolados	Antibióticoterapia 30 dias prévios	Sinais e Sintomas sugestivos de infecção secundária	Antibiótico Resistência
1	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	NUA	Secreção	CL, ER, PE Multiresistente
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	NUA	Secreção e prurido	PE
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	AM	Secreção, dor, ardência e prurido	PE
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	PE, CE	Prurido	PE, OX
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	CE	Prurido	CL, ER, PE, TE
6*	<i>Staphylococcus aureus</i>	AM+CV	Prurido, secreção e dor	CI, CL, ER, OX, PE

* Paciente fez uso de iodeto de potássio não saturado. Demais pacientes não utilizaram antifúngicos 30 dias antes da realização da biópsia.

CL – clindamicina; **CE** – cefalexina; **AM** – amoxicilina; **AM+CV** – amoxicilina + clavulanato; **ER** – eritromicina; **CI** – ciprofloxacina; **OX** – oxacilina; **TE** – tetraciclina; **PE** – penicilina; **NUA** – não utilizou antibiótico.

O tempo de evolução das lesões variou entre 15 e 360 dias, com mediana de 45 dias. A área das lesões variou de 111 a 2765 mm² (mediana 709 mm²). Dentre os sinais e sintomas sugestivos de infecção secundária nas lesões, 80% dos pacientes apresentaram secreção, 56% relataram dor, 56% relataram prurido e 44% relataram ardência. Aqueles com mais de 60 dias de lesão apresentaram maior proporção de infecção secundária que os com menos de 60 dias. As demais variáveis não apresentaram associação com a ocorrência de infecção secundária (tabela 2).

Tabela 2: Análise das variáveis categóricas segundo a ocorrência de infecção secundária nos 64 pacientes com lesões ulceradas de esporotricose atendidos no Rio de Janeiro entre 2013 e 2016.

VARIÁVEIS		Infecção Secundária		<i>p</i> valor
		Sim (N = 6) n (%)	Não (N= 58) n (%)	
Sexo	Homens	1 (16,7)	20 (34,5)	0,654
	Mulheres	5 (83,3)	38 (65,5)	
Idade	< 18 anos	4 (66,7)	21 (36,2)	0,199
	> 18 anos	2 (33,3)	37 (63,8)	
Secreção	Sim	4(66,7)	47 (81,0)	0,593
	Não	2 (33,3)	11 (19,0)	
Dor	Sim	2 (33,3)	34 (58,6)	0,391
	Não	4 (66,7)	24 (41,4)	
Ardência	Sim	1 (16,7)	27 (46,6)	0,219
	Não	5 (83,3)	31 (53,4)	
Prurido	Sim	5 (83,3)	31 (53,4)	0,219
	Não	1 (16,7)	27 (46,6)	
Comorbidade	Sim	1 (16,7)	15 (25,9)	1,000
	Não	5 (83,3)	43 (74,1)	
Nº de lesão	Uma	4 (66,7)	17 (29,3)	0,084
	Duas ou mais	2 (33,3)	41 (70,7)	
Área da lesão	≤ 700 mm ²	3 (50,0)	29 (50,0)	1,000
	> 700 mm ²	3 (50,0)	29 (50,0)	
Tempo de evolução da lesão	≤ 60 dias	2 (33,3)	45 (77,6)	0,038
	> 60 dias	4 (66,7)	13 (22,4)	
Uso de antibiótico prévio	Sim	4 (66,7)	53 (91,4)	0,125
	Não	2 (33,3)	5 (8,6)	
Localização da lesão	MMSS	1 (16,7)	32 (55,2)	0,099
	Outras localizações	5 (83,3)	26 (44,8)	

Bold, significant p-value. MMSS = membros superiores

Todos os pacientes apresentaram epitelização das lesões. O tempo de epitelização variou de 0 a 119 dias, com mediana de 41 dias. Quatro pacientes abandonaram o seguimento do estudo e foram censurados na análise de sobrevivência. No entanto, o contato para resgate dos pacientes após um ano de tratamento confirmou a cura com formação de cicatriz. O tempo de cicatrização variou de 40 a 280 dias, com mediana de 133 dias.

De acordo com a análise de sobrevivência não houve influência da infecção secundária e nem dos sinais e sintomas associados à infecção secundária no tempo necessário para epitelização e cicatrização total das lesões de esporotricose (tabela 3).

Tabela 3: Análise de Kaplan Meyer das variáveis estudadas segundo o tempo de epitelação e cicatrização total dos 64 pacientes com lesões esporotricose, tratados no Rio de Janeiro, entre 2013 e 2016.

Variável	n (%)	Tempo de Epitelização (dias)	Epitelização Log Rank	Tempo de Cicatrização (dias)	Cicatrização Log Rank
		Mediana (Mín.-Máx.)	<i>p valor</i>	Mediana (Mín.-Máx.)	<i>p valor</i>
Infecção	presente	6 (9)	40 (0 - 91)	159 (126 - 231)	
secundária	ausente	58 (91)	41 (0 - 119)	133 (40 - 280)	0,750
	presente	51 (80)	42 (21 - 98)	112 (40 - 252)	
Secreção	ausente	13 (20)	35 (0 - 119)	136 (51 - 280)	0,133
	presente	36 (56)	45 (0 - 98)	145 (47 - 261)	
Dor	ausente	28 (44)	35 (0 - 119)	136 (40 - 280)	0,495
	presente	28 (44)	38 (0 - 98)	145 (56 - 252)	
Ardência	ausente	36 (56)	45 (0 - 119)	136 (40 - 280)	0,823
	presente	36 (56)	45 (0 - 98)	145 (47 - 252)	
Prurido	ausente	28 (44)	40 (0 - 119)	130 (40 - 280)	0,611

Discussão

Este estudo visou identificar a ocorrência de infecção secundária em lesões de esporotricose e sua influência no processo de cicatrização. Não encontramos diferenças nos tempos de epitelação e no tempo para cicatrização definitiva entre os pacientes com e sem infecção secundária das lesões ulceradas. A população estudada apresentou predominância de casos femininos, acometimento de todas as faixas etárias, localização mais comum das lesões nos membros superiores, e a forma clínica mais frequente foi a linfocutânea, assim como foi observado em estudos anteriores (BARROS et al, 2011b; SILVA et al, 2012; ALMEIDA PAES et al, 2014). A concentração da população estudada no estado do Rio de Janeiro reflete a endemia de esporotricose que se instalou no estado (SILVA, et al 2012).

A ocorrência de infecção secundária por bactérias nas lesões ulceradas causadas por *Sporothrix schenckii* sensu lato provavelmente está relacionada com a quebra da integridade da pele provocada pelo fungo (BERGER, 2008; ROSSOLINI; STEFANI, 2009). Um caso de lesão ulcerativa com linfangite nodular e isolamento simultâneo de *Sporothrix* sp. e *Staphylococcus lugdunensis* da mesma lesão foi relatado por MULVANEY et al (2009); no entanto, o reaparecimento da lesão três meses depois levou à realização de uma nova biópsia que possibilitou a identificação de *Leishmania guyanensis* através da reação da polimerase em

cadeia (PCR). A co-infecção de esporotricose e leishmaniose tinha sido relatada previamente em três casos na Colômbia (AGUDELO, 1999). Nesse estudo, embora com áreas de sobreposição parcial de transmissão de esporotricose e LC, coinfeção entre essas duas doenças não foi encontrada. Outros estudos de descrição de infecção secundária por bactérias em lesões de esporotricose não foram encontrados.

A identificação de infecção secundária em nosso estudo foi maior nos pacientes com mais de 60 dias de evolução das lesões ulceradas específicas de esporotricose. O tempo de evolução da lesão reflete o tempo de suscetibilidade do paciente à ocorrência da infecção secundária. Úlceras crônicas são amplamente estudadas quanto à presença de infecção por bactérias (BOWLER et al, 2001, JOCKENHOFER et al, 2013).

A maioria das lesões dos pacientes aqui estudados apresentou secreção, mas sem relação significativa com a ocorrência de infecção secundária. A presença de secreção nas lesões de esporotricose pode também estar relacionada ao processo inflamatório desencadeado pelo fungo (BARROS et al, 2011, QUINTELLA et al, 2011).

O uso de antibioticoterapia nos 30 dias anteriores à biópsia pela maioria da população estudada pode ser uma explicação para a baixa identificação de infecção secundária. No entanto, a identificação de bactérias nas lesões de pacientes com antibioticoterapia prévia poderia induzir a resistência aos antibióticos utilizados. Não encontramos associação da infecção secundária identificada nas lesões de esporotricose com o uso de antibioticoterapia prévia

S. aureus é importante agente causador de infecções na pele e tecidos moles que variam de foliculite a fasciíte necrosante. Na China, um estudo avaliou as características de *S. aureus* oriundo da comunidade em crianças e adultos com infecções cutâneas e de tecidos moles observou 96,6% das 1895 cepas de estudadas com resistência a penicilinas. (LIU et al, 2016). Nesse estudo todas as cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas foram resistentes à penicilina.

Não houve associação da infecção secundária identificada nas lesões de esporotricose ou dos sinais e sintomas correlacionados com o tempo até epitelização e cicatrização total das lesões. A principal bactéria isolada pode ser a explicação para essa ausência de associação. ALMEIDA-PAES et al, (2016) não observaram diferenças na produção de melanização, pigmento importante para a virulência fúngica e sobrevivência no hospedeiro, quando cultivaram *S. brasiliensis* com *S. aureus* e *S. epidermidis*. Deste modo, nossos resultados não indicam a necessidade de antibioticoterapia coadjuvante ao tratamento específico de esporotricose, mesmo na presença de sinais e sintomas sugestivos de infecção secundária. A

decisão quanto ao uso de antibioticoterapia sistêmica e/ou tópica na esporotricose deve ser tomada de acordo com a avaliação individual de cada paciente.

Referências

- AGUDELO, S. P.; RESTREPO, S.; VÉLEZ, I. D. Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 40, n. 6, p. 1002-4, 1999.
- ALMEIDA-PAES R, OLIVEIRA M M E, FREITAS D F S, et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is Associated with Atypical Clinical Presentations. **PloS. Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e3094, 2014.
- BERGER, T. G. General considerations of bacterial diseases. WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. In: **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 1689-94.
- BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 24, n. 4, p. 633-54, 2011.
- BARROS, M. B.; SCHUBACH, A. O.; OLIVEIRA, R. V. C. et al. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole--study of 645 patients. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 52, n. 12, p. e200-6, 2011b.
- BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, n. 2, p. 244-69, 2001.
- BUMA, R.; MAEDA, T.; KAEMI, M. et al. Pathogenic bacteria carried by companion animals and their susceptibility to antibacterial agents. **Biocontrol. Sci.**, Osaka, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24 (ISBN 1-56238-897-5 [Print]; ISBN 1-56238-898-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013, 2014, 2015.
- FRANCESCONI, G.; VALLE, A. C. ; PASSOS, S. et al. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1273-6, 2009.
- JOCKENHÖFER, F.; CHAPOT, V.; STOFFELS-WEINDORF, M. et al. Bacterial spectrum colonizing chronic leg ulcers: a 10-year comparison from a German wound care center. **J. Dtsch. Dermatol. Ges.**, Berlin, v. 12, n. 12, p. 1121-7, 2014
- LIU, Y.; XU, Z.; YANG, Z. et al. Characterization of community-associated *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections: a multicenter study in China. **Emerg. Microbes. Infect.**, New York, v. 5, n. 12, p. e127,

2016.

MULVANEY, P.; ARAM, G.; MAGGIORE, P. R. et al. Delay in diagnosis: trauma- and coinfection-related cutaneous leishmaniasis because of *Leishmania guyanensis* infection. **J. Cutan. Pathol.**, Copenhagen, v. 36, n. 1, p. 53-60, 2009.

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S. et al. Sporotrichosis. **Clin Dermatol.**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 181-7, 2007.

KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W. et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** v. 45, n. 10, p. 1255-65, 2007.

QUINTELLA, L. P. ; LAMBERT-PASSOS, S. R.; VALLE, A. C. F. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **J. Cutan. Pathol.**, Copenhagen, v. 38, n. 1, p. 25-32, 2011.

ROSSOLINI, G. M.; STEFANI, S. Etiology, resistance and diagnostic techniques in skin and skin structure infections. **Infez. Med.**, Roma, v. 17, p. 18-29, 2009. Suplemento 4.

SILVA, M. B.; COSTA, M. M.; TORRES, C. C. et al. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p. 1867-80, 2012.

6 ARTIGO 3: IDENTIFICAÇÃO DO *SPOROTHRIX SCHENCKII* SENSU LATO EM FRAGMENTOS DE LESÃO DE PELE CULTIVADOS EM MEIO nnn PARA DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

ANTONIO, L. F.; PIMENTEL, M. I. F.; LYRA, M. R.; MADEIRA, M. F.; MIRANDA, L. F. C.; ALMEIDA-PAES, R.; BRITO-SANTOS, F.; CARVALHO, M. H. G. F.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* sensu lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Diagn Microbiol Infec Dis**, New York, v. 87, n. 2, p. 118-20, 2017. (Publicado)

Esse artigo foi publicado na revista Diagnostic Microbiology and Infectious Disease e apresenta o meio de cultura NNN + Schneider, usado para cultivar parasitos do gênero *Leishmania*, como um meio alternativo a ser utilizado no cultivo de *Sporothrix schenckii* sensu lato. O artigo responde ao objetivo 5 desta tese.



Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Sporothrix schenckii Sensu Lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis



Liliane de Fátima Antonio ^{a,*}, Maria Inês Fernandes Pimentel ^a, Marcelo Rosandiski Lyra ^a, Maria de Fátima Madeira ^a, Luciana de Freitas Campos Miranda ^a, Rodrigo Almeida Paes ^b, Fábio Brito-Santos ^b, Maria Helena Galdino Figueredo Carvalho ^b, Armando de Oliveira Schubach ^{a,c,d}

^a Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^b Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^c Fellow researcher of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil

^d Fellow researcher ("Cientista do Nosso Estado") of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2016

Received in revised form 7 November 2016

Accepted 9 November 2016

Available online 15 November 2016

Keywords:

Cutaneous leishmaniasis

Sporotrichosis

Culture media

ABSTRACT

Eighty-nine patients with clinical suspicion of leishmaniasis were referred for differential diagnosis. *Sporothrix schenckii* sensu lato was isolated in Novy-MacNeal-Nicolle + Schneider media in 98% of 64 patients with final diagnosis of sporotrichosis. This medium may be suitable for diagnosis of sporotrichosis in areas where cutaneous leishmaniasis is also endemic.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* (World Health Organization, 2010). Sporotrichosis is a subacute or chronic subcutaneous mycosis worldwide distributed but more prevalent in tropical and subtropical areas, caused by the dimorphic fungi *Sporothrix schenckii* sensu lato (Rangel-Gamboa et al., 2016; Chakrabarti et al., 2015). Both are endemic diseases in the State of Rio de Janeiro (RJ). At least 830 cases of sporotrichosis (SES Newsletter, 2014) and 50 cases of CL (Brazilian Ministry of Health, 2016) were reported in RJ between 2013 and 2014.

The most frequent type of CL is the localized form, with single or multiple cutaneous lesions (Brazilian Ministry of Health, 2013; World Health Organization, 2010). The typical ulcer of CL is painless and usually located in areas of skin exposed to insect bites. It has rounded or oval shape, with infiltrated erythematous base and well defined high edges (Pessoa and Barreto, 1948). It may occasionally present with verrucous lesions or with regional lymphadenopathy and nodular lymphangitis (Brazilian Ministry of Health, 2013). The last type (sporotrichoid leishmaniasis) is frequently reported in the Middle East (Cozzani et al., 2011).

Sporotrichosis usually extends along the lymphatic path (lymphocutaneous type) or occasionally remains localized (fixed type).

The rarer disseminated presentations are mainly related to immunodeficiencies (De Lima Barros et al., 2011). The lymphocutaneous type starts with an erythematous papule or pustule that evolves into a nodule or plaque tending to ulcerate. Lymphangitis and secondary lesions (nodules or gums) develop, following the path of lymphatic vessels (De Lima Barros et al., 2011; Ramos-e-Silva et al., 2007). The fixed type presents with a single ulcerated or verrucous lesion at the inoculation site, without lymphatic involvement (De Lima Barros et al., 2011).

The similar clinical features in both diseases lead to differential diagnosis (Pavlidakey et al., 2015; López-Escobar et al., 2007; Tobin and Jinh, 2001).

This study included 89 patients with ulcerated skin lesions and a preliminary clinical suspicion of cutaneous leishmaniasis, who had confirmed diagnosis of leishmaniasis or sporotrichosis at Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, between 2013 and 2015.

A biopsy of a skin lesion was performed as part of the routine differential diagnostic procedures. Fragments of the lesions were cultivated in biphasic Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) plus Schneider media, supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics (200 U penicillin +100 µg streptomycin) to detect the presence of *Leishmania* protozoa as described by Almeida et al. (2011). Some fragments were also cultivated on 2% Sabouraud dextrose agar (SDA) and Mycosel agar (Myc) media at 25 °C. Filamentous fungi were identified by morphological analysis (macro and micromorphology), and suspected isolates of *Sporothrix schenckii* sensu lato were

* Corresponding author. Tel.: +55-(0xx21)-38659541; fax: +55-(0xx21)-38659541. E-mail address: lilianedefatima@gmail.com (L.F. Antonio).

transferred to brain heart infusion (BHI) agar medium at 35 °C for confirmation of fungal dimorphism. Molecular tests for both diseases were not performed in routine procedures, due to their high costs.

Culture for *Leishmania* (NNN + Schneider) were considered positive in microscopic analysis when mobile flagellated parasites with the characteristics of promastigote forms of the protozoa were visualized. Hyphae and conidia recognized in the microscopic evaluation in NNN + Schneider evidenced fungi.

Twenty patients confirmed *Leishmania* parasites growth in NNN + Schneider media, and five had visualization of amastigotes in direct exam or histopathology. There was no fungi growth in NNN + Schneider nor in SDA/Myc media in the fragments of lesions from CL cases. CL patients were infected in RJ in 48% of the cases, and the remaining were infected in other Brazilian states.

Sporothrix schenckii sensu lato strains were isolated in 2% SDA and Myc media from fragments of cutaneous lesions of 64 patients. The time of growth of fungi in these media was 11 days. *Sporothrix schenckii* sensu lato was also isolated in NNN + Schneider media in 98% of these cases (Fig. 1). The average time of growth of fungi in NNN + Schneider media between 26 and 28 °C was 9 days. In all these cases, the culture of aliquots of NNN + Schneider media on SDA, Myc (Fig. 2), and BHI confirmed the identification of *Sporothrix schenckii* sensu lato. All 64 patients with sporotrichosis were infected in RJ; 67% had lymphocutaneous and 33% had fixed cutaneous ulcerated type.

All 89 patients received specific treatment according to each confirmed disease (De Lima Barros et al., 2011; Schubach et al., 2005) and evolved to complete healing of their respective lesions.

We observed that NNN + Schneider media proved to be suitable for the isolation in culture of both *Leishmania* protozoa and *S. schenckii* sensu lato fungi.

The occurrence of the cutaneous fixed type in one third of the patients with sporotrichosis, with similar characteristics to the most typical CL lesions, demonstrates the similarity of the clinical presentation for both diseases in several cases. Moreover, 52 patients with sporotrichosis and a positive Montenegro skin test were previously reported in RJ (De Lima Barros et al., 2005; Barros et al., 2004). Such findings indicate the need for differential diagnosis between these diseases.

Lymphocutaneous lesions of sporotrichoid leishmaniasis also demand differential diagnosis (Tobin and Jinh, 2001). Although we have not observed in this study patients with sporotrichoid CL, some cases with this atypical presentation were reported in endemic areas (Pavlidakey et al., 2015; Hinojosa et al., 2014; Sampaio et al., 1996).

In 1999, three cases of CL and sporotrichosis co-infection were reported in Colombia (Agudelo et al., 1999). We have not identified

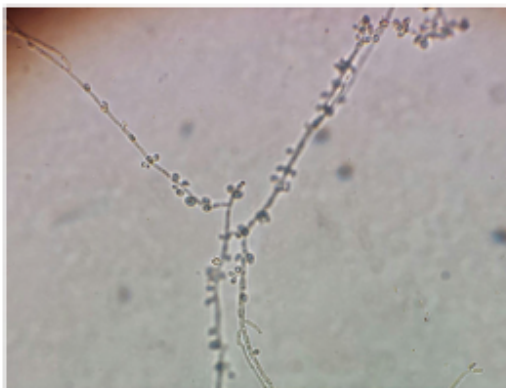


Fig. 1. *Sporothrix schenckii* sensu lato in NNN + Schneider media, magnification 400 X.

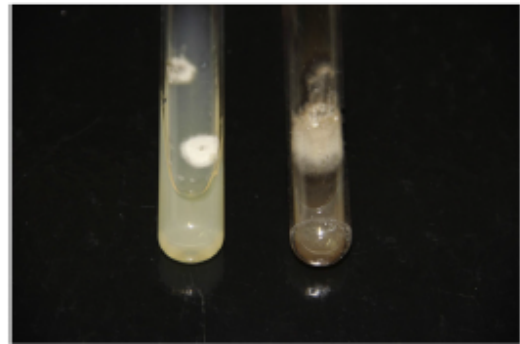


Fig. 2. Aliquots of NNN + Schneider media growth on Sabouraud agar and Mycosel agar.

cases of such co-infection in a reference center for these infectious diseases in an endemic area for both.

The growth of other microorganisms in NNN + Schneider media, which is appropriate for the culture of *Leishmania* parasites, may be frequently interpreted as contamination of the media (Chouihí et al., 2009). The search and identification of the contaminating microorganism is not always a routine procedure, and disposal of the material is usually performed.

NNN + Schneider media are more expensive (equivalent to 41 US dollars in June, 2016) than classical mycological media (25.3 US dollars), and the simple substitution of these media for those ones is not cost-effective. However, when the clinical signs and symptoms point to both leishmaniasis and sporotrichosis, NNN + Schneider media may be performed first; when there is fungi growth in NNN, fungi cultures should subsequently be performed in traditional mycological media. It would save costs when compared to the performance of both *Leishmania* and mycological cultures in parallel.

Fungi growth in both media evidence hyphae and conidia. Culture in BHI is necessary in any case to demonstrate fungal dimorphism. However, mycological traditional media are not suitable for *Leishmania* growth. The main differential characteristic in the microscopic analysis regarding both microorganisms is the mobility of *Leishmania*, when compared to the motionless fungi.

The fungal contamination occurring in NNN + Schneider media during the diagnostic procedures should be evaluated for evidence of the occurrence of sporotrichosis, mainly in RJ. We recommend further studies using NNN as an alternative medium to the growth of *Sporothrix schenckii* sensu lato, especially in areas where leishmaniasis and sporotrichosis endemics overlap.

Financial support

This study was supported by Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ). The funding sources had no role in study design, data collection, analysis, and/or interpretation.

Conflicts of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank all study participants and the staff members of Leishmaniasis and Mycology Laboratories, INI, Fiocruz, for research and administrative support.

References

- Agudelo SP, Restrepo S, Vélez ID. Cutaneous new world leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:1002–4.
- Almeida ABPF, Souza VRP, Sorte ECB, Hgueiredo PB, Paula DAJ, Pimentel MIA, et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011;11:1555–60.
- Barnes MB, Schubach AO, Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Conceição-Silva F, Schubach TM, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of series of cases. *Clin Infect Dis* 2004;38:529–35.
- Brazilian Ministry of Health. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar Americana. Brasília Technical guideline in Portuguese; 2013. 180 pp.
- Brazilian Ministry of Health [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan net). Casos confirmados de LTA por evolução do Caso, 2007 a 2013. [cited 2016 Aug 31]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabzde>. 2015.
- Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol* 2015;53:3–14.
- Chouhri E, Amri F, Boudimi N, Sala E, Selmi K, Zallaguan N, et al. Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis. *Pathol Biol* 2009;57:219–24. [Article in French].
- Cozzani E, Satta R, Fausti V, Cottoni F, Parodi A. Cutaneous sporotrichoid leishmaniasis resistant to pentavalent antimonial therapy: complete resolution with itraconazole. *Clin Exp Dermatol* 2011;36:49–51.
- De Lima Barros MB, Schubach A, Francesconi-do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach TM, Conceição-Silva F, et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop* 2005;53:41–7.
- De Lima Barros MB, Schubach AO, de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira R, Martins EB, Teixeira JL, Wanke B. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole-study of 645 patients. *Clin Infect Dis* 2011;52:e200–6.
- Hinojosa MC, Alvarez DR, Kato H, Hashiguchi Y. Cutaneous sporotrichoid lesion in a patient from a subtropical region of Ecuador. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32:465–6.
- López-Escobar M, Drake-Morfont M, Sales-Gutiérrez de Rozas R, Hermana-Ramírez S. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis. *Actas Dermosifiliogr* 2007;58:444–5. [Article in Spanish].
- Pavlidakey PG, Huynh T, McKay KM, Sami N. Leishmaniasis Panamensis masquerading as Myiasis and sporotrichosis: a clinical pitfall. *Case Rep Pathol* 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/949670>.
- Pessoa S, Barreto M. American Tegumentary leishmaniasis. Rio de Janeiro: Ministry of Education and Health, Documentation Service; 1948 [Book in Portuguese].
- Ramos e-Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin Dermatol* 2007;25:181–7.
- Rangel-Gamboa L, Martínez-Hernández F, Maravilla P, Arenas-Guzmán R, Hissler A. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii sensu lato*. *Med Mycol* 2016;54:248–55.
- Sampaio AMP, Carreta GCF, Motta JOC, Penido AO, Sampaio RNR. Tegumental american leishmaniasis: report of three cases of sporotrichoid form. *An Bras Dermatol* 1996;71:121–4.
- Schubach AdO, Mazochi KBF, Moreira JS, Schubach TMP, Araújo MI, do Vale ACF, et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38:213–7.
- Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro (SES-RJ). Gerência de Transmissíveis por Vetores e Zoonoses. Situação epidemiológica da Esporotricose 2013/2014. *Bol Epidemiol* 2014. [012/2014].
- Tobin EH, Jinh WW. Sporotrichoid lymphocutaneous infections: etiology, diagnosis and therapy. *Am Fam Physician* 2001;63:326–32.
- World Health Organization [Internet]. Technical report series 949. Control of the leishmaniasis. Geneva, 22–26 march. [cited 2016 Nov 5]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf. 2010.

7 ARTIGO 4: LEISHMANIOSE CUTÂNEA E ESPOROTRICOSE: UMA ANÁLISE COMPARATIVA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, LABORATORIAIS E DEMOGRÁFICAS ASSOCIADAS OU NÃO AO TEMPO DE EPITELIZAÇÃO E CICATRIZAÇÃO

OLIVEIRA-ANTONIO, L. F.; LYRA, M. R.; PIMENTEL, M. I. F. et al. Análise comparativa das características clínicas e sociodemográficas da leishmaniose cutânea e da esporotricose no estado do Rio de Janeiro (Em construção)

Esse artigo apresenta resultados adicionais encontrados através da comparação entre casos de leishmaniose cutânea e de esporotricose, destacando as principais semelhanças e diferenças clínicas e evolutivas apresentadas.

Leishmaniose cutânea e esporotricose: uma análise comparativa das características clínicas, laboratoriais e demográficas associadas ou não ao tempo de epitelização e cicatrização.

Resumo:

A leishmaniose cutânea (LC) e a esporotricose são doenças endêmicas no estado do Rio de Janeiro. A LC é causada por parasito do gênero *Leishmania*. A esporotricose é causada por fungos do gênero *Sporothrix*. Ambas possuem manifestação clínica cutânea semelhante e o diagnóstico diferencial é indispensável, principalmente em áreas de superposição das doenças. Visamos identificar e comparar as principais semelhanças e diferenças clínicas e os fatores associados ao tempo de epitelização e cicatrização da LC e da esporotricose. Foi realizado um estudo prospectivo, com uma coorte de 89 pacientes com confirmação diagnóstica de LC ou esporotricose atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), entre outubro de 2013 a fevereiro de 2016. Foram coletados dados sociodemográficos e clínicos e os pacientes foram acompanhados durante e após o tratamento até a resolução da enfermidade, com registro do tempo para epitelização e cicatrização total das lesões e do tipo de cicatriz. A melhora clínica sem tratamento e o padrão de cicatriz linear e pingo de vela foram observados exclusivamente nos casos de esporotricose e o processo de epitelização e cicatrização das lesões de leishmaniose e esporotricose foram diferentemente influenciados pelo sexo, ocorrência de infecção secundária, localização e número de lesões e pelo tempo de evolução pré-tratamento. As diferenças observadas podem auxiliar no diagnóstico diferencial dessas doenças.

Introdução

A leishmaniose cutânea (LC) e a esporotricose são doenças endêmicas no estado do Rio de Janeiro (RJ), com 1859 casos de esporotricose confirmados (SECRETARIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2016a) e 90 casos de LC, entre 2013 e 2015 (SECRETARIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2016b). A distribuição geográfica dessas doenças se superpõe em algumas áreas da região metropolitana do Rio de Janeiro, onde se concentram 95% dos casos de esporotricose (SILVA et al, 2012, KAWA et al, 2010, BARROS, et al, 2010, SCHUBACH, et al, 2005, KAWA E SABROZA, 2002) e cerca de 80% dos casos de leishmaniose tegumentar americana notificados no estado do RJ (SECRETARIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2016b).

A LC é causada por parasito do gênero *Leishmania* (BAPTISTA et al, 2009). Tipicamente apresenta lesão cutânea localizada, ulcerada, única ou em pequeno número, indolor, arredondada, com bordas eritematosas e infiltradas, e com fundo granuloso (OLIVEIRA-NETO et al, 1997a; 1997b; BRASIL, 2013).

A esporotricose é causada pelo fungo dimorfo *Sporothrix schenckii* sensu lato (CHAKRABARTI et al 2015; RAGEL-GAMBOA et al, 2016). A principal forma clínica é a linfocutânea caracterizada por lesões gomosas ou nodulares acompanhando o trajeto linfático, que tendem a ulcerar, com características semelhantes à lesão inicial (BARROS et al, 2011a)

Estas doenças possuem manifestação clínica cutânea semelhante e o diagnóstico diferencial é indispensável em áreas de superposição de ambas. Algumas lesões de LC podem se apresentar como úlceras que progridem com surgimento de lesões gomosas ou nodulares no trajeto linfático, sendo classificadas como leishmaniose esporotricóide (SAMPAIO et al, 1996; HINOJOSA et al, 2014, PAVLIDAKY et al, 2015), e cerca de 30% das lesões de esporotricose apresentam-se com lesões únicas sem linfangite, classificadas como esporotricose fixa, frequentemente úlceras com bordas infiltradas (BARROS et al, 2011a).

O diagnóstico confirmatório da LC e da esporotricose ocorre pela identificação do agente etiológico. Na análise histopatológica, ambas as enfermidades apresentam padrões de alterações teciduais semelhantes e baixas frequências de detecção de microorganismos (QUINTELLA, 2012). Para confirmação da LC é indicado o exame direto de material obtido de lesão por escarificação, punção aspirativa, ou fragmento de lesão, além do isolamento do parasito através de cultura do fragmento de lesão em meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) acrescido de meio Schneider (FURTADO 1980, GONTIJO E CARVALHO, 2003; ALMEIDA et al, 2011; BRASIL, 2013). Pesquisa de DNA do parasito através da reação da polimerase em cadeia (PCR) também é considerado critério de confirmação parasitológica. Para a esporotricose é indicada cultura em meio Mycosel ou agar Sabouraud com posterior demonstração do dimorfismo em meio *Brain Heart Infusion agar* (BHI) (BARROS et al, 2011a). Recentemente, ANTONIO et al (2017) sugeriram a utilização do meio de cultura NNN+Schneider como uma alternativa para isolamento de ambos os microorganismos.

BARROS et al (2005) observaram alta frequência de pacientes com esporotricose apresentando intradermorreação de Montenegro e sorologia para *Leishmania* positivas no município do Rio de Janeiro. LYRA et al (2015) descrevem padrões de cicatrização diferenciado nos casos de esporotricose, que poderiam ser utilizados como auxílio no diagnóstico clínico em casos de lesões ativas concomitantes com lesões cicatrizadas. LOUREIRO et al (2000) em estudo de pacientes com esporotricose utilizando ensaio

imunoenzimático (ELISA) detectaram anticorpos contra um peptídeo de ligação da parede celular do *S. schenckii* com 100% de sensibilidade, entretanto observaram reações cruzadas deste teste nos soros de pacientes com LC.

Diante dessas evidências visamos verificar as principais semelhanças e diferenças clínicas, laboratoriais e demográficas e associação ou não com o tempo de epitelização e cicatrização total das lesões apresentadas por pacientes com LC ou esporotricose, atendidos no Ambulatório de Leishmanioses do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Métodos

Foi realizado um estudo prospectivo, com uma coorte de pacientes com lesões cutâneas ulceradas encaminhados ao Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClin VigiLeish) do INI/FIOCRUZ, para diagnóstico diferencial. Este estudo foi aprovado Comitê de Ética em Pesquisa do INI/FIOCRUZ com o número CAAE 19704113.0.0000.5262 (Anexo 1).

Foram incluídos 89 pacientes com confirmação diagnóstica de LC ou esporotricose, sequencialmente atendidos entre outubro de 2013 e fevereiro de 2016. Os casos de LC foram tratados com antimoniato de meglumina por via intramuscular ou subcutânea, e os casos de esporotricose foram tratados com itraconazol ou terbinafina. Foram excluídos do estudo gestantes, pacientes com leishmaniose cutâneomucosa ou com formas cutâneas disseminada ou difusa, pacientes com esporotricose forma cutânea disseminada e pacientes que não fizeram biópsia no INI ou que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2).

A biópsia foi realizada após assepsia com álcool 70° e anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor. Foi retirado fragmento da borda da lesão ulcerada através de corte com bisturi ou “punch” de 5 a 6 mm. O fragmento foi dividido e enviado para cultura de fungos, análise histopatológica, cultura, PCR e imunohistoquímica para *Leishmania* (FAGUNDES et al. 2010, ALMEIDA et al. 2011, QUINTELA et al. 2012, ANTONIO et al, 2017) e cultura de bactérias aeróbicas e/ou anaeróbicas facultativas e micobactérias. Para a análise de bactérias o tecido foi macerado e inoculado em um dos seguintes meios de cultura: agar sangue com 5% de sangue de carneiro desfibrinado Columbia Agar Base (Merck, Darmstadt, Germany); agar chocolate suplementado com fator V e X (Merck, Darmstadt,

Germany), agar brovacin (Merck, Darmstadt, Germany), e o meio de tioglicolato (Merck, Darmstadt, Germany). O cultivo de micobactérias foi realizado em meio Lowenstein-Jensen e por cultura automatizada com o BACTEC™ MGIT™ 960 Mycobacterial Detection System.

Foram coletados dados sociodemográficos (sexo, idade, área provável de infecção), clínicos (comorbidades, infecção secundária, sinais e sintomas de infecção secundária, número de lesões, localização das lesões, diâmetro da lesão e da úlcera, tempo de evolução das lesões) e laboratoriais (resultado da análise histopatológica e imunohistoquímica). Os pacientes foram acompanhados durante e após o tratamento até a resolução da enfermidade e foi registrado o tempo para epitelização e cicatrização total das lesões, bem como o tipo de cicatriz. Pacientes com LC foram avaliados até a epitelização a cada 10 a 20 dias a partir do início do tratamento. Após a epitelização, os pacientes foram acompanhados em 1, 2, 3, 6, 9 e 12 meses. Pacientes com esporotricose foram avaliados com intervalo de 30 dias até a resolução da enfermidade. Esta periodicidade obedece à rotina de seguimento dos pacientes com cada enfermidade no Ambulatório de Leishmanioses do INI/FIOCRUZ.

Foram avaliados os desfechos de epitelização e cicatrização total das lesões. A epitelização foi definida como lesão que deixou de apresentar solução de continuidade e crostas. No entanto, nesta fase, poderia apresentar descamação, infiltração e/ou eritema. A cicatrização total ou resolução da lesão foi definida como lesão epitelizada sem descamação e infiltração, podendo ou não apresentar eritema residual leve. A melhora clínica antes do tratamento caracterizou-se por diminuição do diâmetro da úlcera, aparecimento de crostas e diminuição da infiltração, ou epitelização total da lesão após a biópsia e antes de iniciar o tratamento.

O tempo de epitelização e cicatrização foi calculado entre a data de início do tratamento e a data de observação da ocorrência de epitelização e cicatrização total da lesão durante o período de acompanhamento. A avaliação final dos casos se deu na consulta em que foi constatada a cicatrização total das lesões. Os pacientes que abandonaram o seguimento após o fim do tratamento foram censurados.

Foram avaliadas as frequências das variáveis categóricas e as medidas de tendência central (mediana, mínimo e máximo) das variáveis contínuas. A associação do diagnóstico (LC ou esporotricose) com as características clínicas foi analisada utilizando o teste de qui-quadrado de Pearson para as variáveis categóricas. Para as variáveis contínuas (consideradas não-normais pelo teste de Kolmogorov-Smirnov) foi empregado o teste de Mann-Whitney.

Uma análise exploratória de sobrevivência do tempo de epitelização e cicatrização total das lesões foi realizada para cada doença. Para o cálculo do efeito de cada variável foi

realizado um modelo semiparamétrico de Cox simples para cada um dos desfechos o tempo em dias para ocorrência de epitelização e cicatrização. Um modelo múltiplo de Cox foi construído utilizando as variáveis significativas nos modelos simples para epitelização e cicatrização total de cada uma das enfermidades. Os testes foram considerados significativos ao nível de 5%. Os efeitos foram interpretados pelas razões de risco (Hazard Ratio – HR) com seus respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%. Foram realizados teste de proporcionalidade de Cox. As análises foram realizadas utilizando-se os programas package survival do software livre R versão 3.0 Core Team (2014) e Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Resultados

Foram incluídos 25 casos de LC e 64 casos de esporotricose. Dentre os casos de LC 3 apresentaram linfagite e 1 apresentou linfangite centrípeta com gomas ao longo do trajeto linfático. Dentre os casos de esporotricose, 43 pacientes (67%) apresentavam a forma linfocutânea e 21 (33%) apresentavam a forma fixa. Em 32 casos de esporotricose houve relato de contanto com gato. A área provável de infecção em 12 casos de LC foi o estado do Rio de Janeiro, e nos outros 13 casos de LC a infecção ocorreu provavelmente em outros diferentes estados do Brasil (Acre, Bahia, Amapá, Amazonas, Maranhão, Minas Gerais, Ceará, Pernambuco). A área provável de infecção de todos os casos de esporotricose foi o estado do Rio de Janeiro. Os municípios Rio de Janeiro e Duque de Caxias se destacaram, concentrando 61% dos casos de esporotricose estudados. A distribuição dos casos segundo a doença e conforme as variáveis analisadas demonstra semelhanças e diferenças significativas (tabela 1).

Tabela 1: Comparação dos dados clínicos, demográficos e laboratoriais coletados, entre os casos de leishmaniose cutânea e esporotricose atendidos entre 2013 e 2016, no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil.

Variáveis	Leishmaniose cutânea		Esporotricose		p valor
	(N = 25)		(N = 64)		
		n (%)		n (%)	
Sexo	Feminino	4 (16,0)	43 (67,2)		<0,001
	Masculino	21 (84,0)	21 (32,8)		
Infecção secundária	Sim	10 (4,0)	6 (9,4)		0,002
	Não	15 (60,0)	58 (90,6)		
Ardência [n (%)]	Sim	10 (40,0)	28 (43,8)		0,815
	Não	15 (60,0)	36 (56,2)		
Dor	Sim	11 (44,0)	36 (56,2)		0,349
	Não	14 (56,0)	28 (43,8)		
Prurido	Sim	11 (44,0)	36 (56,2)		0,349
	Não	14 (56,0)	28 (43,8)		
Secreção	Sim	15 (60,0)	51 (79,7)		0,066
	Não	10 (40,0)	13 (20,3)		
Localização	MMSS¹	7 (28,0)	33 (51,6)		0,009
	MMII²	13 (52,0)	12 (18,8)		
	Outros	5 (20,0)	19 (29,7)		
Número de lesões	Uma	15 (60,0)	21 (32,8)		0,030
	Duas ou mais	10 (40,0)	43 (67,2)		
Tipo de cicatriz⁴	Atrófica	20 (95,2)	28 (46,7)		<0,001
	Outras	1 (4,8)	32 (53,3)		
Visualização do agente na Histopatologia	Sim	14 (56,0)	48 (75,0)		0,122
	Não	11 (44,0)	16 (25,0)		
Comorbidade	Sim	5 (20,0)	16 (25,0)		0,783

	Não	20 (80,0)	48 (75,0)	
		mediana [Mín., Máx.]	mediana [Mín., Máx.]	
Evolução pré-tratamento (dias)		60 [15, 330]	45 [15, 360]	0,002
Idade (anos)		31 [9, 76]	24 [6, 80]	0,248
Área da lesão (mm ²)		942 [94, 10387]	709 [110, 2765]	0,125
Maior Diâmetro da lesão (mm)		36 [12, 115]	35 [14, 80]	0,534
Maior Diâmetro da área ulcerada (mm)		23 [8, 98]	22 [3, 62]	0,188
Tempo de epitelização (dias)		51 [9, 124]	41 [0, 119]	0,635
Tempo de cicatrização (dias)		156 [26, 301]	133 [40, 280]	0,602

¹ MMSS – membros superiores; ² MMII – membros inferiores; ³ Melhora no intervalo decorrido entre o dia da biópsia e o primeiro dia de tratamento. Em 8 pacientes com esporotricose o início do tratamento ocorreu no primeiro dia de atendimento, não sendo possível avaliar a melhora antes do tratamento. ⁴ Em 4 pacientes com LC e 4 com esporotricose não foi possível a análise devido ao abandono de seguimento. **Negrito** – p -valor < 0,05. Mín., Máx – mínimo e máximo.

Durante a fase de investigação foram observados 24 casos de esporotricose com melhora clínica antes do início do tratamento (no período decorrido entre o dia da biópsia e o primeiro dia de tratamento), sendo que 6 destes casos apresentavam a lesão já epitelizada no dia do início do tratamento. No entanto, nenhum dos casos de leishmaniose apresentou melhora clínica da lesão antes do tratamento.

A maioria dos pacientes com LC (95,2%) apresentou cicatriz atrófica após cura da lesão. Já os pacientes com esporotricose apresentaram um padrão de cicatrizes diferenciado. Dos 60 avaliados na cicatrização das lesões de esporotricose, 46,7% apresentaram cicatriz atrófica, 21,7% cicatriz linear, 18,3% cicatriz hipertrófica, 13,3% em “pingo de vela” (figura 1).

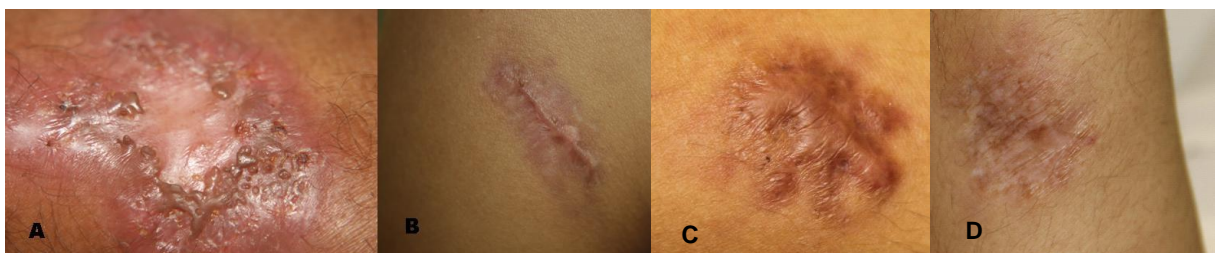


Figura1: Cicatriz de lesões de esporotricose: A – aspecto pingo de vela; B – aspecto linear; C – aspecto hipertrófico; D – aspecto atrófico. Fonte: Lyra M.

Embora a frequência de infecção secundária tenha sido estatisticamente significativa, a presença de sinais e sintomas relacionados à infecção secundária não foi significativa entre ambas as doenças. No entanto, a presença de secreção nas lesões de esporotricose era expressivamente maior. Assim, uma análise excluindo os 16 casos (10 casos de LC e 06 casos de esporotricose) com infecção secundária demonstrou que as lesões de esporotricose apresentam significativamente mais secreção que as lesões de LC quando a infecção secundária está ausente (tabela 2).

Tabela 2: Análise de comparação dos sinais e sintomas relatados na lesão, excluídos os casos com infecção secundária, entre os casos de leishmaniose cutânea e esporotricose atendidos entre outubro de 2013 e fevereiro de 2016 no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil.

Variáveis		Leishmaniose cutânea	Esporotricose	p valor
		(N = 15)	(N = 58)	
		N (%)	n (%)	
Ardência	Sim	3 (20,0)	27 (43,8)	0,081
	Não	12 (80,0)	31 (53,4)	
Dor	Sim	8 (53,3)	34 (58,6)	0,774
	Não	7 (46,7)	24 (41,4)	
Prurido	Sim	5 (33,3)	31 (53,4)	0,247
	Não	10 (66,7)	27 (46,6)	
Secreção	Sim	8 (53,3)	47 (81,0)	0,042
	Não	7 (46,7)	11 (19,0)	

Negrito – p -valor significativo < 0,05

Oito pacientes, 4 com LC e 4 com esporotricose, abandonaram o seguimento. Entretanto, estes pacientes foram resgatados após um ano do tratamento, quando foi constatada a cicatrização total de suas lesões.

De acordo com os modelos de Cox simples, na LC as lesões em membros inferiores e maiores de 30 mm demoraram significativamente mais tempo para epitelizar; lesões com visualização de amastigotas no exame histopatológico e maiores de 30 mm levaram mais tempo para cicatrizar; e as lesões tratadas com antimoniato de meglumina por via intramuscular cicatrizaram também mais rápido. O modelo múltiplo de Cox demonstrou que com o ajuste das variáveis significativas no modelo simples, na LC apenas a localização da lesão continuou influenciando o tempo de epitelização, e o diâmetro da lesão e o tratamento utilizado mantiveram-se influenciando a cicatrização total das lesões (tabela 3).

Nos casos de esporotricose, pacientes com menos de 18 anos apresentaram epitelização das lesões significativamente mais rápida, e as lesões com visualização de fungos no exame histopatológico levaram mais tempo para ocorrência da epitelização. Homens apresentaram lesões com cicatrização mais rápida que as mulheres, e lesões com mais de 60 dias de evolução demoraram mais para apresentar cicatrização. No modelo múltiplo de Cox a variável sexo foi incluída para cicatrização como variável de estratificação para correção do problema de proporcionalidade, não sendo possível avaliar o seu efeito. As demais variáveis significativas no modelo simples mantiveram-se significativas no modelo múltiplo. Além disso, a variável visualização de fungos no exame histopatológico, quando ajustado pelas outras variáveis, influencia também o tempo de cicatrização total das lesões de esporotricose (tabela 4).

Tabela 3: Modelos de Cox simples e múltiplo das variáveis estudadas considerando o tempo de epitelização e tempo de cicatrização, nos casos de leishmaniose cutânea atendidos entre Outubro de 2013 e Fevereiro de 2016, no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil.

Variáveis	Leishmaniose cutânea							
	Epitelização				Cicatrização			
	HR ¹ bruto	IC ²	HR ajustado	IC	HR bruto	IC	HR ajustado	IC
Sexo masculino	1,97	[0,58 – 6,74]	-	-	1,35	[0,44 – 4,09]	-	-
Idade < 18 anos	0,66	[0,22 – 1,98]	-	-	1,22	[0,40 – 3,70]	-	-
Lesão em MMII ³	0,10	[0,03 – 0,39]	0,09	[0,02 – 0,44]	1,83	[0,71 – 4,71]	3,56	[0,99 – 12,84]
Ter duas ou mais lesões	1,50	[0,63 – 3,54]	-	-	2,35	[0,91 – 6,05]	-	-
Evolução da Lesão > 60 dias	0,53	[0,22 – 1,30]	-	-	1,02	[0,42 – 2,48]	-	-
Vizualização de amastigotas/ fungo na histopatologia	0,78	[0,34 – 1,79]	0,51	[0,21 – 1,27]	0,36	[0,14 – 0,92]	0,49	[0,19 – 1,31]
Diâmetro da lesão > 30 mm	0,40	[0,17 – 0,98]	0,89	[0,31 – 2,61]	0,33	[0,12 – 0,92]	0,13	[0,03 – 0,55]
Ter comorbidade	1,61	[0,59 – 4,43]	-	-	0,50	[0,14 – 1,79]	-	-
Tratamento AM – IM ⁴	0,40	[0,16 – 1,02]	0,90	[0,32 – 2,57]	3,31	[1,13 – 9,69]	3,30	[1,08 -10,10]

¹HR – hazard ratio; ²IC – Intervalo de confiança; ³MMII – membros inferiores; ⁴AM – IM – antimoniato de meglumina por via intramuscular; **Negrito** – HR significativo.

Tabela 4: Modelos de Cox simples emúltiplo das variáveis estudadas considerando o tempo de epitelação e tempo de cicatrização, nos casos de esporotricose atendidos entre Outubro de 2013 e Fevereiro de 2016, no LapClinVigileish, Rio de Janeiro, Brazil.

Variáveis	Esporotricose							
	Epitelização				Cicatrização			
	HR ¹ bruto	IC ²	HR ajustado	IC	HR bruto	IC	HR ajustado	IC
Sexo masculino	1,10	[0,64 - 1.89]	1,38	[0,78 – 2,44]	1,91*	[1,10 – 3,33]	-	-
Idade < 18 anos	1,84	[1,10 - 3.08]	1,77	[1,05 – 3,00]	1,41	[0,82 – 2,42]	1,30	[0,72 – 2,34]
Lesão em MMII ³	0,72	[0,38 - 1.36]	-	-	1,15	[0,58 – 2,30]	-	-
Ter duas ou mais lesões	0,87	[0,51 - 1.48]	-	-	1,31	[0,74 – 2,35]	-	-
Evolução da Lesão > 60 dias	1,69	[0,95 - 3.00]	1,35	[0,73 – 2,50]	0,52	[0,27 – 1,00]	0,35	[0,18 – 0,71]
Vizualização de amastigotas/ fungo na histopatologia	0,44	[0,24 - 0.83]	0,45	[0,23 – 0,87]	0,63	[0,35 – 1,14]	0,34	[0,17 – 0,71]
Diâmetro da lesão > 30 mm	0,71	[0,42 - 1.20]	-	-	0,65	[0,37 – 1,12]	-	-
Ter comorbidade	1,11	[0,62 - 1.97]	-	-	0,93	[0,52 – 1,72]	-	-
Outros tipos de cicatriz ⁴	0,84	[0,50 – 1.41]	-	-	1,17	[0,69 – 1,99]	-	-

¹HR – hazard ratio; ²IC – Intervalo de confiança; ³ MMII – membros inferiores; ⁴ Tipos de cicatriz: linear, pingo de vela e hipertrófica. **Negrito** – HR significativo.

*apresentou problemas de proporcionalidade

Discussão

Nesse estudo observamos que o sexo, ocorrência de infecção secundária, localização, tempo de evolução e número das lesões, tipo de cicatriz foram estatisticamente diferentes entre os pacientes com LC e esporotricose. Além disso, a localização influenciou o tempo de epitelização das lesões de LC e o tratamento e o tamanho das lesões influenciaram a cicatrização das lesões de LC. Na esporotricose, a idade e a visualização de fungo na histopatologia influenciaram a epitelização das lesões, e o tempo de evolução das lesões e a visualização de fungos influenciaram a cicatrização das lesões. Observamos que a LC acometeu mais homens, enquanto a esporotricose acometeu mais mulheres, assim como relatado em outros estudos (BARROS et al, 2011b; ALMEIDA-PAES et al, 2014; VITA et al, 2016). A proporção das formas clínicas da esporotricose cutânea apresentada nesse estudo é aproximadamente a mesma observada por BARROS et al (2011b).

Observamos 2,6 vezes mais casos confirmados como esporotricose do que LC encaminhados ao serviço de referência para LC no período estudado, refletindo a dificuldade de diagnóstico diferencial entre as duas doenças, devido às semelhanças clínicas apresentadas entre ambas, como relatado em estudo anterior (BARROS et al 2005).

SALGADO et al, (2016) relataram que as lesões de LC são mais propensas a infecção secundária pois o ambiente gerado pela presença da *Leishmania* poderia propiciar o desenvolvimento de algumas bactérias comensais e dificultar o desenvolvimento de outras menos adaptadas. Nesse estudo observamos uma maior ocorrência de infecção secundária nas lesões de LC do que nas lesões de esporotricose.

A ocorrência de infecção secundária também é tradicionalmente relacionada com sinais e sintomas como dor e presença de secreção. Entretanto, a análise dos casos sem infecção secundária demonstrou que as lesões de esporotricose usualmente são supurativas, enquanto que as lesões de leishmaniose não são. Dentre as características já descritas na literatura que auxiliam a diferenciar a LC da esporotricose na análise histopatológica está a associação da presença de granuloma supurativo com lesões de esporotricose (QUINTELLA et al, 2012).

A maioria dos casos de LC apresentou lesão única, sendo a localização mais comum em membros inferiores. Isto reflete as características da transmissão da doença, com desenvolvimento de lesão no local da picada do inseto vetor com maior frequência em áreas do corpo descobertas, principalmente membros inferiores (BRASIL, 2013). A maioria dos casos de esporotricose apresentou duas ou mais lesões, o que está relacionado à maior

frequência da forma linfocutânea da doença ou múltiplas inoculações do fungo pelo felino doméstico infectado. As lesões de esporotricose foram mais comuns em membros superiores, o que se relaciona com a principal forma de transmissão da doença na epidemia do RJ, através do manuseio de gatos infectados (BARROS et al, 2011).

Na população estudada, o tempo de evolução das lesões de LC foi significativamente maior do que nas lesões de esporotricose. Tradicionalmente, as lesões de LC são descritas como indolores (PESSÔA; BARRETO, 1948), enquanto que as lesões de esporotricose são geralmente referidas como dolorosas pelos pacientes (GUTIERREZ-GALHARDO et al, 2015). Inicialmente, poderíamos inferir que a presença de dor nas lesões levaria os pacientes com esporotricose a procurarem mais rapidamente atendimento médico. Entretanto, nossos achados não evidenciam diferenças significativas quanto à presença de dor entre os pacientes com esporotricose e LC.

A melhora clínica das lesões de esporotricose pode estar relacionada ao desenvolvimento de um processo inflamatório estimulado ou exacerbado pela realização do procedimento de biópsia na lesão, visto que a melhora foi observada somente após a realização da mesma. Algumas doenças dermatológicas, como o granuloma anular, apresentam esse fenômeno de regressão da doença após realização de biópsia (PIETTE; ROSENBACH, 2016). LAUERMANN et al (2012) relataram um caso de esporotricose imitando um ceratoacantoma e apresentando esse mesmo fenômeno. Outra explicação para a ocorrência da melhora clínica nas lesões seria um processo de cura espontânea das lesões (ALMEIDA et al, 2009).

As lesões de esporotricose apresentam tipos de cicatriz específicos que não foram observados na LC. Algumas lesões de esporotricose apresentaram formação de cicatriz linear independente da forma das lesões ou das linhas de tensão da pele, outras desenvolveram cicatriz em forma de “pingo de vela”, isto é, cicatriz atrófica com áreas de hipertrofia que lembram este aspecto. LYRA et al (2015) descrevem esses padrões diferenciados das cicatrizes na esporotricose e sugerem a utilização deles como auxílio na diferenciação clínica, principalmente em casos em que houver simultaneamente lesões cicatriciais e ativas. Nosso estudo confirma que estas características auxiliam na diferença entre LC e esporotricose.

Segundo OLIVEIRA-NETO et. al. (1997), nas lesões de LC o tempo de cicatrização depende principalmente do tamanho e do local das lesões, e lesões em membros inferiores são maiores e demoram mais para curar. Observamos que as lesões de leishmaniose em membros inferiores também levaram mais tempo para epitelizar. O tamanho das lesões ajustado pela localização não influenciou o tempo de epitelização, pois na população estudada as maiores

lesões estavam localizadas em membros inferiores. As maiores lesões levaram mais tempo para obtenção de cicatrização total, no entanto a localização não teve influência sozinha ou ajustada por outras variáveis.

As lesões tratadas com antimoniato de meglumina por via intramuscular cicatrizaram mais rápido que as lesões tratadas com antimoniato de meglumina por via intralesional. A dose de antimoniato de meglumina acumulada no tratamento por via intramuscular é muito superior à dose administrada por via intralesional (SCHUBACH et al, 2005a; VASCONCELLOS et al, 2012), o que poderia explicar os resultados encontrados.

As lesões de esporotricose dos pacientes com menos de 18 anos epitelizaram mais rápido. BARROS et al (2008) observaram 81 crianças com esporotricose com boa resposta ao tratamento em 66 delas e cura espontânea em 6 pacientes.

Os casos em que o fungo foi visualizado no exame histopatológico levaram mais tempo para epitelizar e cicatrizar. QUINTELLA et. al. (2011) não observaram relação entre duração média da lesão (tempo necessário para epitelizar/cicatrizar) e os casos com e sem visualização fúngica; no entanto, a sensibilidade desta visualização no exame histopatológico relatada pelos autores foi menor que a encontrada em nosso estudo. A visualização dos fungos está relacionada com maior concentração do agente na lesão. FREITAS et al (2012) em uma série de casos de esporotricose em pacientes infectados pelo vírus do HIV visualizou o fungo na histopatologia em 91% dos 11 casos em que o exame foi realizado; a imunossupressão induzida pelo vírus do HIV levaria a uma carga fúngica elevada. Em pacientes imunocompetentes com esporotricose, por outro lado, foram visualizados fungos no exame histopatológico em 38% dos casos da forma linfocutânea e 44% da forma fixa (MORGADO et al., 2016).

O tempo de evolução das lesões antes do tratamento não apresentou influência no tempo necessário para epitelização e cicatrização das lesões de leishmaniose. Entretanto, ANTONIO et al, (2014) demonstraram que as lesões de LC com menor tempo de evolução apresentam maior chance de falhar ao tratamento. Já os casos de esporotricose com mais de 60 dias de evolução demoraram mais tempo para cicatrizar. Uma explicação pode estar relacionada com a produção de níveis elevados de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e óxido nítrico liberados após a disseminação da levedura nos tecidos, que levam à síntese de moléculas supressoras da resposta de células T, como interleucina 10 (IL-10), a proteína transmembrana Fas-ligante (Fas-L) e o antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) (FERNANDES et al, 2008). A produção de TNF- α é drasticamente diminuída quatro a seis semanas após a infecção experimental, permitindo ao fungo reproduzir e infectar tecidos do

hospedeiro. Após dois meses da infecção, uma situação oposta acontece, quando os níveis de IL-1 e TNF- α aumentam, favorecendo a eliminação do fungo (CARLOS et al, 1994).

Possíveis limitações do estudo são a ausência de utilização de uma escala de dor na avaliação dos pacientes e o tamanho reduzido dessa coorte, em especial dos casos de LC.

Enquanto o tempo de epitelização e de cicatrização total das lesões de LC foram influenciados pelo tamanho e localização da lesão e/ou forma de tratamento utilizada, o tempo de epitelização e de cicatrização total das lesões de esporotricose foram influenciados pelo sexo, idade, tempo de evolução da lesão e/ou visualização do fungo no exame histopatológico. Observamos que o sexo, a ocorrência de infecção secundária, a localização e o número de lesões, a melhora antes do tratamento, o tipo de cicatriz e o tempo de evolução pré-tratamento foram significativamente diferentes entre as doenças. Entretanto, devemos destacar a melhora clínica antes do tratamento e o padrão de cicatriz linear e pingo de vela que foram observados exclusivamente nos casos de esporotricose. As diferenças clínicas observadas podem auxiliar no diagnóstico diferencial das lesões cutâneas ulceradas dessas doenças, especialmente em áreas onde ocorra a superposição geográfica de ambas.

Referências

- ALMEIDA, H. L. JR.; LETTNIN, C. B.; BARBOSA, J. L. et al. Spontaneous resolution of zoonotic sporotrichosis during pregnancy. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 237-8, 2009.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUZA, V. R. F.; SORTE, E. C. B. et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Larchmont, v. 11, n. 12, p. 1555-60, 2011.
- ALMEIDA-PAES R, OLIVEIRA M M E, FREITAS D F S, et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is Associated with Atypical Clinical Presentations. **PloS. Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e3094, 2014.
- ANTONIO, L. F.; FAGUNDES, A.; OLIVEIRA, R. V. C. et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 5, p. 375-80, 2014.
- ANTONIO, L. F.; PIMENTEL, M. I.; LYRA, M. R. et al. *Sporothrix schenckii* Sensu Lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 87, n. 2, p. 118-120, 2017.
- BAPTISTA, C.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. et al. *Leishmania (Viannia) brasiliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Exp. Parasitol.**, New

York, v. 121, n. 4, p. 317-22, 2009.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A. C. et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. **Acta. Trop.**, Basel, 93:41–7, 2005.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. et al. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil; epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 136, n. 9, p. 1192-6, 2008.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O. et al. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Rev. Panam. Salud. Pública**, Washington, v. 27, n. 6, p. 455-60, 2010.

BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 24, n. 4, p. 633-54, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2a edição atualizada. Brasília, DF: O Ministério; 2013.

CARLOS, I. Z.; ZINI, M. M.; SGARBI, D. B. et al. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 127, n. 3, p. 189-94, 1994.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.

FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A. O. ; DE PAULA, C. C. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 109-12, 2010.

FERNANDES, K. S.; NETO, E. H.; BRITO, M. M. et al. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. **Immunology**, Oxford, v. 123, n. 4, p. 469-79, 2008.

FREITAS, D. F. S.; HOAGLAND, B. S.; VALLE, A. C. F. do, et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Med Mycol.**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 170-8, 2012.

FURTADO T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 2, p. 81-6, 1980.

GONTIJO B, CARVALHO, Mde. L. American cutaneous leishmaniasis. **Rer. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GUTIERREZ-GALLARDO, M. C.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F. Clinical Forms of human sporotrichosis and host immunocompetence. In: CARLOS, I. Z. (editora). *Sporotrichosis*, 2015, p. 74. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-11912-0_5. Acesso em: 01 jun. 2017.

- HINOJOSA, M. C.; ALVAREZ, D. R.; KATO, H. et al. Cutaneous sporotrichoid lesion in a patient from a subtropical region of Ecuador. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v. 32, n. 7, p. 465–6, 2014.
- KAWA, H.; SABROZA, P. C. Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 853-65, 2002.
- KAWA, H.; SABROZA, P. C.; OLIVEIRA, R. M. et al. Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 8, p. 1495-507, 2010.
- LAUERMANN, F.; LYRA, M.; GAUDIO, R.; Sporotrichosis mimicking keratoacanthoma. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 86, n. 5, p.741, 2012.
- LYRA, M. R.; VALLE, A. C.; PIMENTEL, M. I. et al. Scar examination in sporotrichosis: An additional tool for clinical diagnosis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, Vellore, v. 81, n. 3, p. 290-2, 2015.
- LOUREIRO-Y-PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 1-7, 2000.
- MORGADO, F. N.; SCHUBACH, A. O.; PIMENTEL, M. I. et al. Is There Any Difference between the In Situ and Systemic IL-10 and IFN- γ Production when Clinical Forms of Cutaneous Sporotrichosis Are Compared? **Plos One**, San Francisco, v. 11, n. 9, p. e0162764, 2016.
- OLIVEIRA-NETO, M. P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M. et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. **Pathol. Biol.**, Paris, v. 45, n. 6, p. 496-9, 1997a.
- OLIVEIRA-NETO, M. P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M. et al. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies up to 10 years **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 57, n. 6, p. 651-5, 1997b.
- PAVLIDAKEY, P. G.; HUYNH, T.; MCKAY, K. M. et al. Leishmaniasis Panamensis masquerading as Myiasis and sporotrichosis: a clinical pitfall. **Case Rep Pathol.**, New York, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568050/>>. Acesso em: 16 ago. 2016.
- PESSÔA, S.; BARRETO, M. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: **Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação**; 1948.
- PIETTE, E. W.; ROSENBAACH, M. Pathogenesis, disease associations and triggers, and therapeutic options. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 75, n. 3, p. 467-79, 2016.
- QUINTELLA, L. P. ; LAMBERT-PASSOS, S. R.; VALLE, A. C. F. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **J. Cutan. Pathol.**, Copenhagen, v. 38, n. 1, p. 25-32, 2011.
- QUINTELLA, L. P.; PASSOS, S. R. L.; MIRANDA, L. H. M. et al. Proposal of a

histopathological rule for the differential diagnosis between American tegumentar leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.167, n. 4, p. 837-46, 2012.

RANGEL-GAMBOA, L.; MARTÍNEZ-HERNANDEZ, F.; MARAVILLA, P. et al. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii* sensu lato. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 248–55, 2016.

SALGADO, V. R.; QUEIROZ, A. T. L.; SANABANI, S. S. et al. The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 4, p. 241-51, 2016.

SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F.; MOREIRA, J. S. et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 38, n. 3, p. 213-7, 2005.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Boletim Epidemiológico 007/2016. Vigilância e Cenário Epidemiológico: Esporotricose no Estado do RJ. Rio de Janeiro, RJ, out. 2016a.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Boletim Epidemiológico 003/2016. Vigilância das Leishmanioses no Estado do Rio de Janeiro - 2007 a 2015. Rio de Janeiro, RJ, fev. 2016b.

SILVA, M. B.; COSTA, M. M.; TORRES, C. C. et al. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p. 1867-80, 2012.

VASCONCELLOS, E. C. F.; PIMENTEL, M. I. F.; SCHUBACH, A. O. et al. Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 87, n. 2, p. 257-60, 2012.

VITA, G. F.; PEREIRA, M. A.; FERREIRA, I. et al. Status of the American tegumentary leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil, from 2004 to 2013. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 58:71, 2016.

8 CONCLUSÕES

- A presença de bactérias nas lesões cutâneas de LC e esporotricose não influenciou o tempo necessário para epitelização e cicatrização das lesões.
- A bactéria mais frequentemente encontrada nas lesões de LC e esporotricose foi *Staphylococcus aureus*. Dois casos de *Candida* sp. foram isolados em lesões de LC, e nenhum outro fungo foi isolado em lesões de esporotricose.
- A presença de ardência e secreção na lesão de LC aumentou o tempo necessário para epitelização da lesão.
- O meio de cultura NNN + Schneider pode servir como mais uma ferramenta para o diagnóstico da esporotricose.
- Temos evidências clínicas de que as lesões de LC infectadas levam mais tempo pra epitelizar (cura imediata). Este fato sugere que a antisepsia da lesão e o uso de antibioticoterapia, recomendados por recentes estudos no manejo de feridas crônicas, pode ser benéfico.
- Nossos dados não sugerem a indicação generalizada para o uso de antibioticoterapia associada ao tratamento específico das lesões de esporotricose
- A melhora clínica antes do tratamento e o padrão de cicatriz linear e pingo de vela ocorreram em pacientes com esporotricose, mas não naqueles com LC.
- O processo de epitelização e cicatrização das lesões de LC e esporotricose são influenciados por fatores diferentes. Na LC a localização da lesão influenciou o tempo de epitelização, e o diâmetro da lesão e o tratamento utilizado

influenciaram a cicatrização total das lesões. Nos casos de esporotricose, a idade e a visualização de fungos no exame histopatológico influenciaram no tempo de epitelização da doença, e o tempo de evolução da doença e a visualização de fungos no exame histopatológico ajustados por sexo influenciaram no tempo de cicatrização total .

- As diferenças clínicas observadas (sexo, ocorrência de infecção secundária, localização, tipo de cicatriz, tempo de evolução e número das lesões) foram significativamente diferentes entre LC e esporotricose e podem auxiliar no diagnóstico diferencial entre estas duas doenças.

9 CONSIDERAÇÕES FUTURAS

Estudos futuros devem ser realizados com uma coorte maior para o desenvolvimento de uma regra de predição clínica para lesões cutâneas de leishmaniose e esporotricose. Um modelo de predição clínica poderá auxiliar os médicos na avaliação de lesões cutâneas para o diagnóstico diferencial entre leishmaniose e esporotricose em condições de carência de exames complementares para a confirmação do diagnóstico.

REFERÊNCIAS

- AGUDELO, S. P.; RESTREPO, S.; VÉLEZ, I. D. Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. **J. Am. Acad. Dermatol.**, St. Louis, v. 40, n. 6, p. 1002-4, 1999.
- ALMEIDA, H. L. JR.; LETTNIN, C. B.; BARBOSA, J. L. et al. Spontaneous resolution of zoonotic sporotrichosis during pregnancy. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 237-8, 2009.
- ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUZA, V. R. F.; SORTE, E. C. B. et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, Larchmont, v. 11, n. 12, p. 1555-60, 2011.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E; FREITAS, D. F. S. et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is Associated with Atypical Clinical Presentations. **PloS. Negl. Trop. Dis.**, San Francisco, v. 8, n. 9, p. e3094, 2014.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E; FREITAS, D. F. S. et al. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. **Med. Mycol.**, Oxford, pii: myw103, 2016.
- ANTONIO, L. F.; FAGUNDES, A.; OLIVEIRA, R. V. C. et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 5, p. 375-80, 2014.
- ANTONIO, L. F.; PIMENTEL, M. I.; LYRA, M. R. et al. *Sporothrix schenckii* Sensu Lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 87, n. 2, p. 118-120, 2017.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E. et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clin. Microbiol. Infect.**, Paris, v. 15, n. 7, p. 651-5, 2009.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B.; MENDONÇA, S. C. F. Comparative study of two antimonial therapy schedules for treating cutaneous leishmaniasis. In: XXIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease, Caxambu, 92. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, 1997. Suplemento 1.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A. et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 101, n. 7, p. 735-7, 2007.
- AZULAY, R. D. Micose subcutânea e sistêmicas. In: **Dermatologia**, 6nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara 2013. p. 285-7.
- BAPTISTA, C.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. et al. *Leishmania (Viannia) brasiliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations

of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 121, n. 4, p. 317-22, 2009.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; ALMEIDA, R. et al. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 47, n. 5, p. 587-92, 1992.

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G. et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 53, n. 5, p. 256-9, 1995.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. M.; GALHARDO, M. C. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 777-9, 2001.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; GALHARDO, M. C. G. et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Dermatol.**, Philadelphia, v. 42, n. 9, p. 677-81, 2003.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, A. O.; VALLE, A. C. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of series of cases. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 38, n. 4, p. 529-35, 2004.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, A.; FRANCESCONI-DO-VALLE, A. C. et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. **Acta Trop.**, Basel, 93:41-7, 2005.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M. et al. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil; epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 136, n. 9, p. 1192-6, 2008.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O. et al. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Rev. Panam. Salud. Pública**, Washington, v. 27, n. 6, p. 455-60, 2010.

BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 24, n. 4, p. 633-54, 2011a.

BARROS, M. B.; SCHUBACH, A. O.; OLIVEIRA, R. V. C. et al. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole--study of 645 patients. **Clin Infect Dis.**, Chicago, v. 52, n. 12, p. e200-6, 2011b.

BARROSO-FREITAS, A. P.; PASSOS, S. R.; MOUTA-CONFORT, E. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 103, n. 4, p. 383-9, 2009.

BASU, S.; RAMCHURAN PANRAY, T.; BALI SINGH, T. et al. A prospective, descriptive study to identify the microbiological profile of chronic wounds in outpatients. **Ostomy Wound Manage**, King of Prussia, v. 55, n. 1, p. 14-20, 2009.

BAYAT, A.; MCGROUTHER, D. A.; FERGUSON, M. W. Skin scarring. **BMJ**. London, v. 326, n. 7380, p. 88-92, 2003.

BERGER, T. G. General considerations of bacterial diseases. WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. In: **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 2008. p. 1689-94.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 560-86, 1988.

BORGES, E. L.; JÚNIOR, J. F. P.; ABREU, M. N. S. et al. Factors associated with the healing of complex surgical wounds in the breast and abdomen: retrospective cohort study. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 24, p. e2811, 2016

BOWLER, P. G.; DUERDEN, B. I.; ARMSTRONG, D. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, n. 2, p. 244-69, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2a edição atualizada. Brasília, DF: O Ministério; 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Vigilância em Saúde - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos Confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/ltarj.def>>. Acesso em 29 set. 2016.

BROUWER S, BARNETT TC, RIVERA-HERNANDEZ T, et al. Streptococcus pyogenes adhesion and colonization. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 590, n. 21, p. 3739-57, 2016.

BUMA, R.; MAEDA, T.; KAEMI, M. et al. Pathogenic bacteria carried by companion animals and their susceptibility to antibacterial agents. **Biocontrol. Sci.**, Osaka, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2006.

CADOGAN, J.; BALDWIN, D.; CARPENTER, S. et al. Identification, diagnosis and treatment of wound infection. **Nurs. Stand.**, Harrow, v. 26, n. 11, p. 44-8, 2011.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K. Wound healing. **Arq. Bras. Cir. Dig.**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-8, 2007.

CARLOS, I. Z.; ZINI, M. M.; SGARBI, D. B. et al. Disturbances in the production of interleukin-1 and tumor necrosis factor in disseminated murine sporotrichosis. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 127, n. 3, p. 189-94, 1994.

CARVALHO, M. T. M.; CASTRO, A. P.; BABY, C. et al. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 35, n. 6, p. 655-9, 2002.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. Global

epidemiology of sporotrichosis. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.

CHELLAN, G.; SHIVAPRAKASH, S; RAMAIYAR, S. K. et al. Spectrum and Prevalence of Fungi Infecting Deep Tissues of Lower-Limb Wounds in Patients with Type 2 Diabetes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 48, n. 6, p. 2097-102, 2010.

CHOUIHI, E.; AMRI, F.; BOUSLIMI, N. et al. Cultures on NNN medium for the diagnosis of leishmaniasis. **Pathol Biol.**, Paris, v. 57, n. 3, p. 219–24, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24 (ISBN 1-56238-897-5 [Print]; ISBN 1-56238-898-3 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2013, 2014, 2015.

COOPER, R. A.; AMEEN, H.; PRICE, P. et al. A clinical investigation into the microbiological status of 'locally infected' leg ulcers. **Int. Wound. J.**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 453-62, 2009.

COTA, G. F.; SOUSA, M. R.; FEREGUETTI, T. O. et al. The cure rate after placebo or no therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 2, e.0149697, 2016.

COZZANI, E.; SATTA, R.; FAUSTI, V. et al. Cutaneous sporotrichoid leishmaniasis resistant to pentavalent antimonial therapy: complete resolution with itraconazole. **Clin. Exp. Dermatol.**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 49–51, 2011.

DONADEL, K. W.; REINOSO, Y. D.; DE OLIVEIRA, J. C. et al. Esporotricose: revisão. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, p. 45-52, 1993.

DOUDI, M.; SETORKI, M.; NARIMANI, M. Bacterial superinfection in zoonotic cutaneous leishmaniasis. **Med. Sci. Monit.**, Warsaw, v. 18, n. 9, p. BR356-61, 2012.

DOWD, S. E.; DELTON HANSON, J.; REES, E. et al. Survey of fungi and yeast in polymicrobial infections in chronic wounds. **J. Wound. Care.**, Ruislip, v. 20, n. 1, p. 40-7, 2011a.

DOWD, S. E.; WOLCOTT, R. D.; KENNEDY, J. et al. Molecular diagnostics and personalised medicine in wound care: assessment of outcomes. **J. Wound. Care.**, Ruislip, v. 20, n. 5, p. 234-9, 2011b.

DRESSEL, S.; HARDER, J.; CORDES, J. et al. Differential expression of antimicrobial peptides in margins of chronic wounds. **Exp Dermatol.**, Copenhagen, v. 19, n. 7, p. 628-32, 2009.

DUQUE, M. C.; VASCONCELLOS, E. C.; PIMENTEL, M. I. et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 49, n. 6, p. 774-6, 2016.

EDRISSIAN, G. H.; MOHAMMADI, M.; KANANI, A. et al. Bacterial infections in

suspected cutaneous leishmaniasis lesions. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 6, n. 4, p. 473-7, 1990.

EUSTACE, K. E.; SAMPAIO F. M.; LYRA M. R. et al. Cutaneous disseminated sporotrichosis complicated by osteomyelitis. **Acta. Derm. Venereol.**, Stockholm, v. 93, n. 2, p. 192-3, 2013.

FACKLAM, R. R.; SAHM, D. F.; TEIXEIRA, L. M. Enterococcus. In: MURRAY PR, BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Org.). **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. p. 297-303.

FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A. O.; DE PAULA, C. C. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 109-12, 2010.

FAGUNDES, A.; ANTONIO, L. F.; SCHUBACH, A. O. et al. Comparison between in vivo measurement of the Montenegro skin test and paper recording. **Int. J. Dermatol.**, Philadelphia, v. 51, n. 5, p. 618-9, 2012.

FALQUETO, A.; SESSA, P. A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Org.). **Veronesi Tratado de Infectologia**. 2nd ed. São Paulo: Atheneu 1997. p. 1221-33.

FARAH, F. S.; KLAUS, S. N.; FRANKENBURG, S. et al. Protozoan and helminth infections. In: *Dermatology in General Medicine*, Vol II, 4th Ed. New York: McGraw-Hill; 1993; 2772-2777.

FERREIRA, C. P.; DO VALLE, A. C.; FREITAS, D. F. et al. Pregnancy during a sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Int. J. Gynaecol. Obstet.**, New York, v. 117, n. 3, p. 294-5, 2012.

FERNANDES, K. S.; NETO, E. H.; BRITO, M. M. et al. Detrimental role of endogenous nitric oxide in host defence against *Sporothrix schenckii*. **Immunology**, Oxford, v. 123, n. 4, p. 469-79, 2008.

FIERHELLER, M.; SIBBALD, R. G. A clinical investigation into the relationship between increased periwound skin temperature and local wound infection in patients with chronic leg ulcers. **Adv. Skin Wound Care**, Springhouse, v. 23, n. 8, p. 369-79, 2010.

FONTES, C. O.; CARVALHO, M. A. R.; NICOLI, J. R. et al. Identification and antimicrobial susceptibility of micro-organisms recovered from cutaneous lesions of human American tegumentary leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, Endinburgh, v. 54, n. 11, p. 1071-6, 2005.

FRANCESCONI, G.; VALLE, A. C. ; PASSOS, S. et al. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Oxford, v. 23, n. 11, p. 1273-6, 2009.

FRANK, D. N.; WYSOCKI, A.; SPECHT-GLICK, D. D. et al. Microbial diversity in chronic

open wounds. **Wound Repair Regen**, St. Louis, v. 17, n. 2, p. 163-72, 2009.

FREITAS, D. F.; DE SIQUEIRA HOAGLAND, B.; DO VALLE, A. C. et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 170-8, 2012.

FURTADO T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 2, p. 81-6, 1980.

GARCIA, L. S.; ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. 2nd ed. Washington, DC: ASM, 2007.

GONÇALVEZ, A. P.; PERYASSU, D. A esporotricose no Rio de Janeiro, 1936-1953. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 1, p. 1-12, 1954.

GONÇALVES, E. G. R.; REIS FILHO, S. A.; OLIVEIRA, E. G. et al. Infecção bacteriana na leishmaniose cutânea: padrão bacteriano e sensibilidade a antibióticos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, n. 2, p. 219-21, 2009.

GONTIJO B, CARVALHO, Mde. L. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GROGL, M.; THOMASON, T. N.; FRANKE, E. D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 47, n. 1, p. 117-26, 1992.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; VALLE, A. C.; FRAGA, B. L. et al. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. **Mycoses**, Berlin, v. 53, n. 1, p. 78-80, 2010.

GUTIERREZ-GALLARDO, M. C.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F. Clinical Forms of human sporotrichosis and host immunocompetence. In: CARLOS, I. Z. (editora). Sporotrichosis, 2015, p. 74. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-11912-0_5. Acesso em: 01 jun. 2017.

HAN, A.; ZENILMAN, J. M.; MELENDEZ, J. H. et al. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds. **Wound Repair Regen**, St. Louis, v. 19, n. 5, p. 532-41, 2011.

HENCKAERTS, L.; NAESSENS, R.; Vlieghe, E. et al. A tropical diabetic foot. **Acta. Clin. Belg.**, Bruxelles, v. 67, n. 5, p. 362-4, 2012.

HERWALDT BL, BERMAN JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostan) and review of pertinent clinical studies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 46, n. 3, p. 296-306, 1992.

HINOJOSA, M. C.; ALVAREZ, D. R.; KATO, H. et al. Cutaneous sporotrichoid lesion in a patient from a subtropical region of Ecuador. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, Barcelona, v. 32, n. 7, p. 465-6, 2014.

HORNER, R.; LISCANO, M. G. H.; MARASCHIN, M. M. et al. Suscetibilidade antimicrobiana entre amostras de *Enterococcus* isoladas no Hospital Universitario de Santa Maria. **J Bras Patol Med Lab.**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, p. 391-5, 2005.

IBGE. **Projeção da População do Brasil por sexo e idade: 2000-2060**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2013/default_tab.shtm>. Acesso em: 01 jan. 2016.

JOCKENHÖFER, F.; CHAPOT, V.; STOFFELS-WEINDORF, M. et al. Bacterial spectrum colonizing chronic leg ulcers: a 10-year comparison from a German wound care center. **J. Dtsch. Dermatol. Ges.**, Berlin, v. 12, n. 12, p. 1121-7, 2014

KASHEM, S. W.; KAPLAN, D. H. Skin Immunity to *Candida albicans*. **Trends Immunol.**, Oxford, v. 37, n. 7, p. 440-50, 2016.

KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W. et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** v. 45, n. 10, p. 1255-65, 2007.

KAWA, H.; SABROZA, P. C. Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro. **Cad Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 853-65, 2002.

KAWA, H.; SABROZA, P. C.; OLIVEIRA, R. M. et al. Production of transmission foci for cutaneous leishmaniasis: the case of Pau da Fome, Rio de Janeiro, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 8, p. 1495-507, 2010.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. **Diagnostico Microbiológico**. 5th ed. Sao Paulo: Medsi, 2001. p. 302.

KÖRBER, A.; SCHMID, E. N.; BUER, J. et al. Bacterial colonization of chronic leg ulcers: current results compared with data 5 years ago in a specialized dermatology department. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Amsterdam, v. 24, n. 9, p. 1017-25, 2010.

LANDIS, S. J. Chronic wound infection and antimicrobial use. **Adv. Skin. Wound. Care.**, Springhouse, v. 21, n. 11, p. 531-40, 2008.

LAUERMANN, F.; LYRA, M.; GAUDIO, R.; Sporotrichosis mimicking keratoacanthoma. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 86, n. 5, p.741, 2012.

LAWN, S. D.; YARDLEY, V.; VEGA-LOPEZ, F. et al. New World cutaneous leishmaniasis in returned travellers: treatment failures using intravenous sodium stibogluconate. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 97, n. 4, p. 443-5, 2003.

LIPSKY, B. A.; HOEY, C. Topical antimicrobial therapy for treating chronic wounds. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 49, n. 10, p. 1541-9, 2009.

LIU, Y.; XU, Z.; YANG, Z. et al. Characterization of community-associated *Staphylococcus aureus* from skin and soft-tissue infections: a multicenter study in China. **Emerg. Microbes. Infect.**, New York, v. 5, n. 12, p. e127,

2016.

LLANOS-CUENTAS, A.; TULLIANO, G.; ARAUJO-CASTILLO, R. et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 46, n. 2, p. 223-31, 2008.

LÓPEZ-ESCOBAR, M.; DRAKE-MONFORT, M.; SALESA-GUTIÉRREZ DE ROZAS R, et al. Sporotrichoid cutaneous leishmaniasis. **Actas Dermosifiliogr.**, Madrid, v. 98, n. 6, p. 444-5, 2007.

LOUREIRO-Y-PENHA, C. V.; LOPES-BEZERRA, L. M. Concanavalin A-binding cell wall antigens of *Sporothrix schenckii*: a serological study. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 1-7.

LYRA, Marcelo Rosandiski. **Ensaio clínico fase 3 para leishmaniose tegumentar americana forma cutânea. Equivalência entre esquemas de alta e baixa dose de antimoniato de meglumina**, 2013. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2013.

LYRA, M. R.; VALLE, A. C.; PIMENTEL, M. I. et al. Scar examination in sporotrichosis: An additional tool for clinical diagnosis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol.**, Vellore, v. 81, n. 3, p. 290-2, 2015.

LYRA, M. R.; PASSOS, S. R.; PIMENTEL, M. I. et al. Pancreatic toxicity as an adverse effect induced by meglumine antimoniate therapy in a clinical trial for cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.58, n. 68, p. 1-6, 2016.

MACEDO, P. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 719-24, 2015.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatol. Res. Pract.**, Cairo, v. 2014, n. 272376, p. 1-13, 2014.

MARSDEN, P. D.; TADA, M. S.; BARRETO, A. C. et al. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis* skin ulcers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 78, n. 4, p. 561-2, 1984.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 359-75, 1994. Suplemento 2.

MELLO, C. X.; SCHUBACH, A. O.; MADEIRA, M. F. Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 44, n. 1, p. 127, 2011.

MELLO, C. X.; MADEIRA, M. F. Skin Scraping is the Most Accessible Technique for the Parasitological Diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 92, n. 5, p. 1082, 2015.

- MILLER, C. N. ; CARVILLE, K. ; NEWALL, N. et al. Assessing bacterial burden in wounds: comparing clinical observation and wound swabs. **Int. Wound. J.**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 45-55, 2011.
- MOREIRA, J. A., FREITAS, D. F., LAMAS, C. C. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. **Infection.**, Heidelberg, v. 43, n. 3, p. 267-76, 2015.
- MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clin Exp Dermatol.**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 427-31, 2002.
- MULVANEY, P.; ARAM, G.; MAGGIORE, P. R. et al. Delay in diagnosis: trauma- and coinfection-related cutaneous leishmaniasis because of *Leishmania guyanensis* infection. **J. Cutan. Pathol.**, Copenhagen, v. 36, n. 1, p. 53-60, 2009.
- NAVARRO, P.; SILVA, S.; DE LA PARTE, M. A. et al. Utilidad del cefadroxilo en leishmaniosis tegumentaria americana coinfecciones piógenas sobreagregadas. **Kasmera.**, Maracaíbo, v. 32, n. 2, p. 131-9, 2009.
- OLIVEIRA, L. F.; SCHUBACH, A. O.; MARTINS, M. M. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Trop.**, Basel, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.
- OLIVEIRA-NETO, M. P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M. et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. **Pathol. Biol.**, Paris, v. 45, n. 6, p. 496-9, 1997a.
- OLIVEIRA-NETO, M. P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, M. et al. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 57, n. 6, p. 651-5, 1997b.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Technical Report Series 949. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva, 22-26 March 2010. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em: 13 mai. 2013.
- ÖZTURK, F.; ERMERTCAN, A. T. Wound healing: a new approach to the topical wound care. **Cutan. Ocul. Toxicol.**, Philadelphia, v. 30, n. 2, p. 92-9, 2011.
- PASSOS, V. M.; BARRETO, S. M.; ROMANHA, A. J. et al. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 78, n. 8, p. 968-74, 2000.
- PAVLIDAKEY, P. G.; HUYNH, T.; MCKAY, K. M. et al. Leishmaniasis Panamensis masquerading as Myiasis and sporotrichosis: a clinical pitfall. **Case Rep Pathol.**, New York, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568050/>>. Acesso em: 16 ago. 2016.
- PIETTE, E. W.; ROSENBAACH, M. Pathogenesis, disease associations and triggers, and therapeutic options. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 75, n. 3, p. 467-79, 2016.

PESSÔA, S.; BARRETO, M. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rio de Janeiro: **Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação**; 1948.

QUINTELLA, L. P. ; LAMBERT-PASSOS, S. R.; VALLE, A. C. F. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **J. Cutan. Pathol.**, Copenhagen, v. 38, n. 1, p. 25-32, 2011.

QUINTELLA, L. P.; PASSOS, S. R. L.; MIRANDA, L. H. M. et al. Proposal of a histopathological rule for the differential diagnosis between American tegumentar leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. **Br. J. Dermatol.**, Oxford, v.167, n. 4, p. 837-46, 2012.

RABELLO, E. Caso de leishmaniose. **Boletim da Sociedade Brasileira de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 72, 1913.

RAJAN, S. Skin and soft-tissue infections: classifying and treating a spectrum. **Cleve. Clin. J. Med.**, Cleveland, v. 79, n. 1, p. 57-66, 2012.

RAMIREZ, J.; BYRD, R. P. JR.; ROY, T. M. Chronic cavitary pulmonary sporotrichosis: efficacy of oral itraconazole. **J. Ky. Med. Assoc.**, Louisville, v. 96, n. 3, p. 103-5, 1998.

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S. et al. Sporotrichosis. **Clin Dermatol.**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 181-7, 2007.

RANGEL-GAMBOA, L.; MARTÍNEZ-HERNANDEZ, F.; MARAVILLA, P. et al. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii* sensu lato. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 248–55, 2016.

REIS, C. M. S.; SCHECHTMAN, R. C.; AZULAY D. R. Esporotricose. In: AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R.; AZULAY-ABULAFIA, L. Dermatologia. 6th ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 2013, p. 508-12.

RIBEIRO, Carla de Oliveira. **Estudo comparativo entre pacientes com leishmaniose tegumentar americana com resolução espontânea e aqueles que foram submetidos a tratamento específico no INI, FIOCRUZ**, 2015. Tese (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2015.

RODRIGUES, A. M.; HUEB, M.; SANTOS, T. A. R. R. et al. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 39, n. 2, p. 139-45, 2006.

RODRIGUEZ-BRITO, S.; CAMACHO, E.; MENDOZA, M. et al. Differential identification of *Sporothrix* spp. And *Leishmania* by conventional PCR and qPCR in multiplex format. **Med. Mycol.**, Oxford, v. 53, n. 1, p. 22-7, 2015.

ROMERO, G. A.; GUERRA, M. V.; PAES, M. G. et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Trop.**, Basel, v. 79, n. 3, p. 225-9, 2001.

- ROMERO, G. A. S.; GUERRA, M. V. F.; PAES, M. G. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 65, n. 5, p. 456-65, 2001.
- ROSA, M. E. A.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, immunological, and therapeutic aspects. **Drug. Dev. Res.**, New York, v. 72, n. 6, p. 437-41, 2011.
- ROSANOVA, M. T.; BASILICO, H.; VILLASBOAS, M. et al. Fungal infections in a pediatric burn care. **Arch. Argent. Pediatr.**, Buenos Aires, v. 109, n. 5, p. 437-44, 2011.
- ROSSOLINI, G. M.; STEFANI, S. Etiology, resistance and diagnostic techniques in skin and skin structure infections. **Infez. Med.**, Roma, v. 17, p. 18-29, 2009. Suplemento 4.
- ROUPÉ, K. M.; NYBO, M.; SJÖBRING, U. et al. Injury is a major inducer of epidermal innate immune responses during wound healing. **J. Invest. Dermatol.** Baltimore, v. 130, n. 4, p. 1167-77, Abr. 2010. Erratum in: **J. Invest. Dermatol.** v. 130, n. 3, p. 910, Mar. 2010.
- SADEGHIAN, G.; ZIAEI, H.; BIDABADI, L. S. et al. Decreased effect of glucantime in cutaneous leishmaniasis complicated with secondary bacterial infection. **Indian J. Dermatol.**, Kolkata, v. 56, n. 1, p. 37-9, 2011.
- SALGADO, V. R.; QUEIROZ, A. T. L.; SANABANI, S. S. et al. The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 4, p. 241-51, 2016.
- SAMPAIO, A. M. P.; CARRETA, G. C. F.; MOTTA, J. O. C. et al. Tegumental American leishmaniasis: report of three cases of sporotrichoid form. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 121-4, 1996.
- SANTOS, I. B.; SCHUBACH, T. M. P.; LEME, L. R. P. et al. Sporotrichosis – the main differential diagnosis with tegumentary leishmaniasis in dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p. 1-6, 2007.
- SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F.; MOREIRA, J. S. et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 38, n. 3, p. 213-7, 2005a.
- SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; BARROS, M. B. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 353, n. 11, p. 1185-6, 2005b.
- SCHUBACH, A. O.; BARROS, M. B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, London, v. 21, n. 2, p. 129-33, 2008.
- SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Boletim Epidemiológico 012/2014. Situação Epidemiológica da Esporotricose 2013/2014, RJ, dez. 2014.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Boletim Epidemiológico 007/2016. Vigilância e Cenário Epidemiológico: Esporotricose no Estado do RJ. Rio de Janeiro, RJ, out. 2016a.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Gerência de doenças transmitidas por vetores e zoonoses. Boletim Epidemiológico 003/2016. Vigilância das Leishmanioses no Estado do Rio de Janeiro - 2007 a 2015. Rio de Janeiro, RJ, fev. 2016b.

SGONC, R.; GRUDER, J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. **Gerontology**, New York, v. 59, n. 2, p. 159-64, 2013

SHIRAZI, M.H.; RANJBAR, R.; ASGARI, V. et al. Study of bacterial infections among the patients with suspected cutaneous leishmaniasis. **Pak. J. Biol. Sci.**, Faisalabad, v. 10, n. 24, p. 4555-8, 2007.

SILVA, J. P. Como calcular a area e o perimetro de uma elipse? São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www2.fc.unesp.br/revistacqd/v3n1/v3n1_art1.pdf>. Acesso em: 20 out. 2016.

SILVA, M. B.; COSTA, M. M.; TORRES, C. C. et al. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cad Saude Publica**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 10, p. 1867-80, 2012.

SILVA, R. E.; TOLEDO, A. JÚNIOR; SENNA, M. C. et al. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 8, p. 512-6, 2016.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 3, p. 239-51, 2004.

STECHMILLER, J. K. Understanding the role of nutrition and wound healing. **Nutr. Clin. Pract.** Baltimore, v. 25, n. 1, p. 61-8, 2010.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v. 13, n. 1, p. 47-52, 2009.

TAKENAKA, M.; SATO, S.; NISHIMOTO, K. Survey of 155 sporotrichosis cases examined in Nagasaki Prefecture from 1951 to 2007. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**. Tokyo, v. 50, n. 2, p. 101-8, 2009.

TAZIMA MFGS, VICENTE YAMVA, MORIYA T. Biologia da Ferida e Cicatrização. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 41, n. 3, p. 259-64, 2008.

TLOUGAN, B. E.; PODJASEK, J. O.; PATEL, S. P. et al. Neonatal sporotrichosis. **Pediatr Dermatol.**, Boston, v. 26, n. 5, p. 563-5, 2009.

TOBIN, E. H.; JINH, W. W. Sporotrichoid lymphocutaneous infections: etiology, diagnosis

and therapy. **Am. Fam. Physician**, Kansas City, v. 63, n. 2, p. 326–32, 2001.

TURKSEN, Z.; YAĞCI, S.; KARADAĞ, A. S. et al. Posttraumatic primary cutaneous aspergillosis with *Candida guilliermondii* infection in a healthy host. **Mikrobiyol. Bul.**, Ankara, v. 44, n. 4, p. 665-70, 2010.

TUTTLE, M. S.; MOSTOW, E.; MUKHERJEE, P. et al. Characterization of bacterial communities in venous insufficiency wounds by use of conventional culture and molecular diagnostic methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.49, n. 11, p. 3812-9, 2011.

VAN DER VLIET, D.; LE GUERN, A-S.; FREITAG, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* otochondritis complicating localized cutaneous leishmaniasis: prevention of mutilation by early antibiotic therapy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 75, n. 2, p. 270–2, 2006.

VASCONCELLOS, E. C. F.; PIMENTEL, M. I. F.; VALETE-ROSALINO, C. M. et al. Efetividade e segurança do antimoniato de meglumina intralesional no tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana forma cutânea. **Rer. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 43, p. 52-5, 2010. Suplemento 2.

VASCONCELLOS, E. C. F.; PIMENTEL, M. I. F.; SCHUBACH, A. O. et al. Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 87, v. 2, p. 257-60, 2012.

VERA, L. A.; SANTOS, J. B.; MACÊDO, V. O. et al. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 34, n. 3, p. 233-37, 2001.

VERA, L. A.; MACEDO, V. O.; MAGALHÃES, A. V. et al. Úlceras leishmanióticas cutâneas com presença de *Corynebacterium diphtheriae*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 35, n. 4, p. 311-3, 2002.

VERA, L. A.; MACEDO, J. L.; CIUFFO, I. A. et al. Antimicrobial susceptibility of aerobic bacteria isolated from leishmaniotic ulcers in Corte de Pedra, BA. **Rer. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 47-50, 2006.

VILELA, R.; SOUZA, G. F.; FERNANDES COTA, G. et al. Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 24, n. 2, p. 161-3, 2007.

VITA, G. F.; PEREIRA, M. A.; FERREIRA, I. et al. Status of the american tegumentary leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil, from 2004 to 2013. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, São Paulo, v. 22, p. 58:71, 2016.

YAMADA, K.; ZAITZ, C.; FRAMIL, V. M. et al. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide. A 24 year experience in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 2, p. 89-93, 2011.

YEBOAH-MANU, D.; KPELI, G. S.; RUF, M. T. et al. Secondary bacterial infections of buruli ulcer lesions before and after chemotherapy with streptomycin and rifampicin. **PLoS**.

Negl. Trop. Dis., San Francisco, v. 7, n. 5, p. e2191, 2013.

ZIAEI, H.; SADEGHIAN, G.; HEJAZI, S. H. Distribution frequency of pathogenic bacteria isolated from cutaneous leishmaniasis lesions. **Korean J. Parasitol.**, Seoul, v. 46, n. 3, p. 191-3, 2008.

Anexo I: Parecer consubstanciado do CEP

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A presença de bactérias e fungos em lesões ulceradas de leishmaniose cutânea e de esporotricose e sua possível influência na resposta terapêutica

Pesquisador: Maria Inês Fernandes Pimentel

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 19704113.0.0000.5262

Instituição Proponente: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC / FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 428.685

Data da Relatoria: 14/10/2013

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose tegumentar americana é uma importante antropozoonose no Brasil, que acomete todas as unidades da federação. A lesão típica da leishmaniose cutânea é uma úlcera com bordas infiltradas e centro granuloso com escassa secreção. Entretanto, na úlcera de leishmaniose podem estar presentes bactérias e fungos, levando a maior quantidade de secreção purulenta e crostas que poderiam dificultar a cicatrização. A esporotricose é uma infecção fúngica dispersa por todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. No Rio de Janeiro, há pouco mais de 15 anos, vem ocorrendo uma expressiva epidemia desta doença, transmitida principalmente por gatos infectados. A maioria dos pacientes apresenta a forma linfocutânea caracterizada por úlcera cutânea acompanhada por linfangite e nódulos ou gomas ao longo do trajeto linfático. Entretanto, alguns pacientes apresentam lesão única - geralmente ulcerosa com bordas infiltradas, podendo ser também verrucosa, vegetante, placa infiltrada ou tuberosa - ou em pequeno número, no local da inoculação do fungo, sem disseminação linfática ou hemática. Este quadro é conhecido como forma fixa da enfermidade e constitui um importante diagnóstico diferencial com leishmaniose cutânea no Rio de Janeiro. O presente projeto tem como objetivo verificar a presença de bactérias e fungos nas úlceras cutâneas de leishmaniose e de esporotricose, e averiguar se esta presença de bactérias e/ou fungos interfere com a epitelização e cicatrização das lesões ulceradas, com a

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 428.685

resolução da enfermidade e com o tempo necessário para alcançar tais desfechos. Trata-se de um estudo de coorte prospectivo. Serão elegíveis para o estudo todos os pacientes com leishmaniose cutânea e com esporotricose, com lesões ulceradas, atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Por ocasião dos procedimentos para investigação diagnóstica, as úlceras cutâneas serão biopsiadas para coleta de fragmentos para exame bacteriológico (bacterioscopia e cultura de bactérias aeróbicas e facultativas), para cultura para *Leishmania* spp e para cultura para fungos em meios apropriados. Será verificada a resposta à terapêutica específica a partir do primeiro dia do tratamento, com a ocorrência ou não de epitelização e cicatrização da úlcera, com a resolução da enfermidade, bem como o tempo (contado em dias) necessário para alcançar tais desfechos. Os tempos para ocorrência de epitelização, cicatrização total e resolução da enfermidade serão comparados entre os pacientes com tratamento específico semelhante que apresentem ou não bactérias e/ou fungos nas úlceras por ocasião do diagnóstico. Serão considerados ainda diferentes esquemas terapêuticos empregados para a leishmaniose, localização distinta das lesões e a espécie ou espécies de bactérias e/ou fungos identificadas em lesões ulceradas de leishmaniose e de esporotricose. Espera-se que os pacientes que apresentem bactérias e/ou fungos nas suas lesões específicas apresentem maior frequência de insucesso terapêutico, bem como necessitem de um maior período de tempo para alcançar a epitelização e cicatrização. Espera-se, ainda, que tal evolução possa ser diferenciada para cada espécie bacteriana ou fúngica identificada, para tratamentos diversos em ambas enfermidades e para diferentes localizações das lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Comparar os pacientes com presença ou ausência de bactérias e/ou fungos nas lesões ulceradas de leishmaniose cutânea ou de esporotricose em relação à resposta terapêutica e as espécies de bactérias ou fungos identificados. Objetivo Secundário: (1) Verificar a presença de bactérias ou fungos nas lesões ulceradas de LC e de esporotricose; (2) Verificar a associação entre a presença ou não de bactérias e/ou fungos nas lesões ulceradas de LC ou de esporotricose com a ocorrência ou não de epitelização e de cicatrização, com a resolução da enfermidade e com o tempo necessário para a sua ocorrência; (3) Descrever as espécies de bactérias e fungos mais frequentes nas lesões ulceradas de LC e de esporotricose; (4) Identificar a ocorrência de contaminação por bactérias e/ou fungos nas culturas de fragmento de lesão cutânea para *Leishmania* e para *Sporothrix schenckii*, correlacionando com as bactérias e/ou fungos isolados diretamente das lesões ulceradas de LC ou de esporotricose; (5) Verificar a possível associação entre as diferentes espécies de bactérias e/ou fungos isoladas com a ocorrência ou não de epitelização, de

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

**INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ**



Continuação do Parecer: 428.685

cicatrização e de resolução da enfermidade, bem como com o tempo necessário para a sua ocorrência; (6) Descrever o uso de antibioticoterapia e/ou terapia antifúngica tópica e/ou sistêmica nos 30 dias prévios à realização da biópsia para a confirmação diagnóstica; e, (7) Verificar a possível associação entre o uso de antibioticoterapia e/ou terapia antifúngica tópica e/ou sistêmica nos 30 dias antecedendo a realização da biópsia com a ocorrência ou não de epitelização, de cicatrização e de resolução da enfermidade, bem como com o tempo necessário para a sua ocorrência.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá risco adicional em relação ao estudo para os indivíduos, já que a coleta de fragmentos de lesão cutânea para exame bacteriológico, exame micológico e cultura para Leishmania da lesão ulcerada são procedimentos de rotina para o diagnóstico da enfermidade no Lab Vigileish. Os resultados do exame bacteriológico e micológico não interferirão com a escolha da dose ou via de administração do medicamento para os pacientes participantes do estudo. Benefícios: Não haverá benefícios para os participantes do estudo, entretanto o estudo poderá contribuir para estabelecimento de protocolos de atendimento dos futuros pacientes com lesões ulceradas de leishmaniose cutânea e esporotricose. Lembro que os riscos associados à coleta de amostras biológicas serão informados e consentidos pelo sujeito de pesquisa em TCLE do projeto "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz.", aprovado por esse comitê em 2002 (CAAE 0016.0.009.000), do qual todos os pacientes acompanhados no ambulatório do LabVigiLeish (IPEC/FIOCRUZ) incluídos nessa pesquisa serão signatários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo prospectivo (2013-2015) submetido a esse comitê para julgamento ético "A presença de bactérias e fungos em lesões ulceradas de leishmaniose cutânea e de esporotricose e sua possível influência na resposta terapêutica" é apresentado como um subprojeto de outro, intitulado "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz.", de 2002, já submetido e aprovado por esse comitê (CAAE 0016.0.009.000) e, mesmo por isso, apresenta o mesmo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do segundo para o consentimento da pesquisa ora proposta. Apesar do objetivo principal da pesquisa, a saber, "Comparar os pacientes com presença ou ausência de bactérias e/ou fungos nas lesões ulceradas de leishmaniose cutânea ou de esporotricose em relação à resposta terapêutica e as espécies de bactérias ou fungos identificados.", não estar explicitamente listado naqueles do projeto de CAAE 0016.0.009.000, é

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipecc.fiocruz.br

**INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ**



Continuação do Parecer: 428.685

possível relaciona-lo ao objetivo "Descrever aspectos da LTA... tentando estabelecer padrões de apresentação da doença e seu modo de evolução...", informado no TCLE. Ainda nesse TCLE, estão previstas autorizações específicas para: 1) utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo; e, 2) para que parte do material coletado periodicamente para a realização de exames para acompanhamento da evolução da sua doença, assim como os resultados destes exames de rotina e do seu tratamento sejam utilizados neste estudo, assim como da coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; e, retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de "língua", de pele ou de mucosa (lesadas ou aparentemente sadias) para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias)...; todas previstas na metodologia apresentada para o desenvolvimento do projeto atual. Por todos esses motivos, parece razoável que o atual projeto seja mesmo caracterizado como subprojeto daquele de CAAE 0016.0.009.000. O estudo é de extrema relevância e, por isso, uma vez que os participantes dessa pesquisa, ou seus representantes legais, tenham consentido participação no atual estudo por meio do TCLE ora apresentado, referente ao projeto de CAAE 0016.0.009.000, indicaremos a aprovação imediata com a previsão de produção de relatórios semestrais (parciais ou final), de acordo com a Res. CNS no. 466/12-X.1.b.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Serão incluídos no estudo participantes signatários do TCLE relativo ao projeto "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz", aprovado por esse comitê em 2002 (CAAE 0016.0.009.000) e que tiverem com isso consentidas a documentação fotográfica e a coleta de fragmentos de lesão cutânea.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.045-900

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ipec.fiocruz.br

INSTITUTO DE PESQUISA
CLÍNICA EVANDRO CHAGAS -
IPEC / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 428.685

Considerações Finais a critério do CEP:

RIO DE JANEIRO, 18 de Outubro de 2013

Léa Camillo

Assinador por:
Léa Ferreira Camillo-Coura
(Coordenador)

Dr^a Léa Ferreira Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
Mat. SIAPE 003709620
IPEC / FIOCRUZ

Anexo II: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido¹

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

ENDEREÇO: Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900

TELEFONES (0xx21) 3865-9167 / 3865-9609 / FAX (0xx21) 3865-9541

NOME DO PROJETO DE PESQUISA: ESTUDO PARA A SISTEMATIZAÇÃO DO ATENDIMENTO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM LTA - INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - FIOCRUZ

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que atinge seres humanos e animais, incluindo o cão, causada por parasitos chamados Leishmanias. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, tuberculose, sífilis, esporotricose, outras micoses, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e precisam ser diferenciadas para que se possa iniciar o tratamento correto. Entretanto, com os exames existentes atualmente, nem sempre se consegue ter certeza absoluta sobre qual a doença em questão.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? quais as melhores formas de tratamento? que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no INI-Fiocruz, com os seguintes objetivos:

- ✓ Descrever aspectos da LTA: manifestações clínicas e exames de laboratório, tentando estabelecer padrões de apresentação da doença e seu modo de evolução, comparando com outras doenças.

¹ 1ª via: Prontuário Médico

2ª via: Paciente

- ✓ Avaliar o uso dos antimoniais e outras drogas utilizadas no tratamento da LTA levando em consideração o tempo de tratamento, toxicidade, facilidade de administração, custo e ausência de envolvimento das mucosas do nariz e da garganta.
- ✓ Isolar, identificar e comparar as leishmanias causadoras da LTA provenientes de diversas localidades.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da Instituição. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para o diagnóstico da sua doença, e que parte deste material, assim como os resultados destes exames de rotina, sejam utilizados neste estudo. Também será necessária a sua autorização: 1) para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo 2) para que parte do material coletado periodicamente para a realização de exames para acompanhamento da evolução da sua doença, assim como os resultados destes exames de rotina e do seu tratamento sejam utilizados neste estudo 3) para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para a Dra Cláudia Maria Valette Rosalino, Dra. Maria Inês Pimentel, Dr. Marcelo Rosandiski Lyra, Dra. Mariza Salgueiro ou Dr. Armando de Oliveira Schubach nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - Fiocruz.

Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante o tratamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

Antes do tratamento haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame

interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de "íngua", de pele ou de mucosa (lesadas ou aparentemente saudáveis) para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias) quanto para pesquisa (identificação de células e outros componentes da resposta inflamatória, assim como novos métodos de identificação dos possíveis agentes da doença). Outros materiais também poderão ser coletados na tentativa de isolamento do agente causador da doença: aspiração com seringa e agulha do bordo da lesão e de secreções em lesões de pele fechadas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de serem confundidas com a LTA, para classificar a gravidade da doença e avaliar os efeitos dos medicamentos a serem utilizados durante o seu tratamento: um a quatro testes cutâneos (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para determinada doença na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista entre 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade equivalente a aproximadamente três colheres de sopa), exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário complementada por tomografia computadorizada); exames da audição e do equilíbrio (se necessários); exames fonoaudiológicos para testar motricidade oral, fala e deglutição (se necessários); exame odontológico (se necessário); acompanhamento fonoaudiológico (se necessário); avaliação nutricional e dietética (se necessário); e eletrocardiograma.

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia, geralmente, durante um período de 30 dias contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime.

Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas dentro de 10, 20 e 30 dias. Caso as lesões não cicatrizem totalmente, o tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Ao se atingir a cura clínica, você deverá retornar para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos).

A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma ou duas colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados.

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, os testes na pele poderão apresentar uma reação forte com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao

aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no INI.

No local da biópsia poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos.

O medicamentos glucantime e pentamidina costumam causar efeitos indesejáveis, não devem ser utilizados na gravidez e seu uso em mulheres em idade reprodutiva deve ser acompanhado de uso de método anticoncepcional eficaz como preservativo de látex masculino ou feminino ("camisinha"), diafragma feminino ou anticoncepcional oral ("pílula"). Quando o tratamento não puder ser adiado, a anfotericina B poderá ser utilizada na gravidez. Os exames com raios-x também não devem ser realizados em grávidas.

Formas de ressarcimento:

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço social do INI para pacientes externos.

Benefícios esperados:

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado a buscar o tratamento mais adequado para o seu caso.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

Nome paciente:

Data

Nome médico:

Data

Nome testemunha²:

Data

Nome testemunha²:

Data

² Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

