



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

---

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS  
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

CINTIA XAVIER DE MELLO

**COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE "IMPRINT" E  
ESCARIFICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

RIO DE JANEIRO  
2011

**COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE "IMPRINT" E  
ESCARIFICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

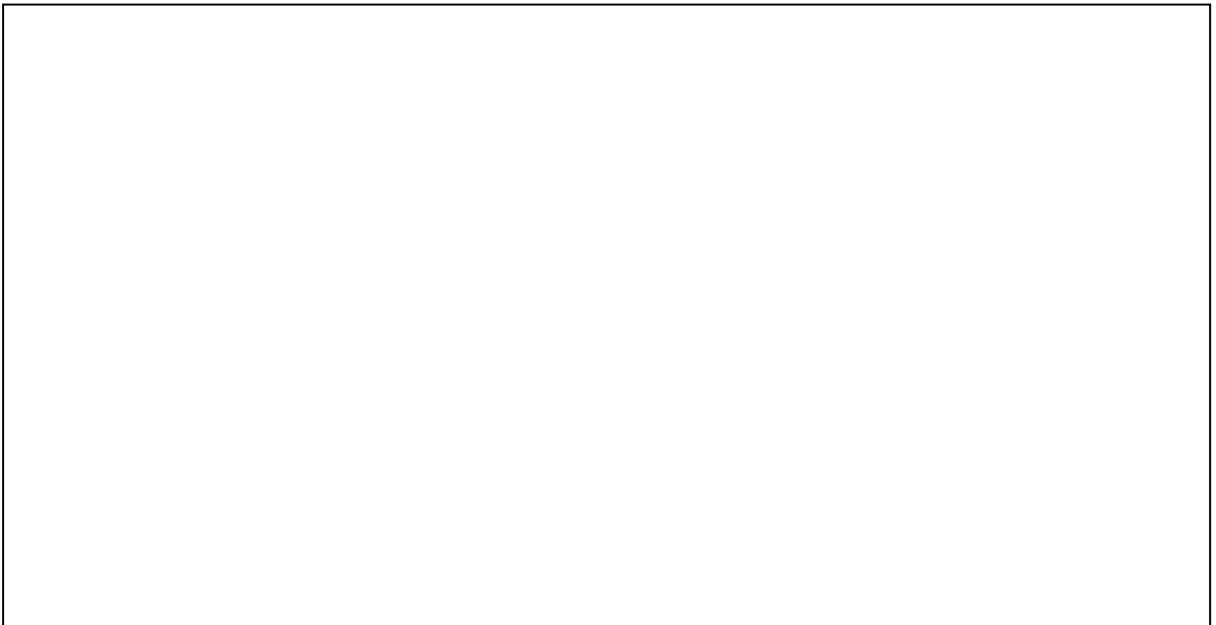
CINTIA XAVIER DE MELLO

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientado pela Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira

RIO DE JANEIRO  
2011

Ficha catalográfica

A large, empty rectangular box with a thin black border, occupying the lower half of the page. It is intended for a catalog card (Ficha catalográfica).

CINTIA XAVIER DE MELLO

**COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE "IMPRINT" E  
ESCARIFICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira

Aprovada em: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ .

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof. Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi (Presidente)**

Doutor em Parasitologia Aplicada

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

---

**Prof. Dr. Fátima Conceição-Silva (Componente)**

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

---

**Prof. Dr. Maria Inês Pimentel (Componente)**

Doutorado em Medicina

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

*A Deus*

*A minha mãe*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, razão da minha existência, aquele que tem suprido todas as minhas necessidades e realizado todos os meus sonhos.

A toda a **minha família**, em especial minha **mãe**, por todo o incentivo, por tudo que me ensinou, por me orientar nas minhas escolhas, enfim pelo apoio incondicional.

Ao **Sr. Robson Reis** e **Sr. Joaquim Pereira**, os primeiros mestres que tive quando cheguei ao IPEC, foram mais que mestres, foram amigos, que me apoiaram e me ajudaram a chegar até aqui.

A todos os **colegas do Vigileish** por todo o apoio, torcida e momentos de descontração.

A todos os **colegas** que integram a **equipe médica do Vigileish**, pela excelente recepção e apoio que permitiram a realização do projeto.

A todos os **colegas do laboratório de Parasitologia**: Sem vocês não seríamos completos!

Aos colegas de trabalho que se tornaram grandes amigos: **Arsena, Simone, Wanda, Ana Claudia, Sidnei, Alessandra e Cibele**, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis e por comemorarem comigo as minhas vitórias.

A minha orientadora, **Dr<sup>a</sup> Fátima Madeira**, por estar sempre presente, pelos conselhos, pelo investimento e confiança em mim. Sem seu apoio nada disso seria possível: Muito obrigada!!

A **Dr<sup>a</sup> Raquel Vasconcelos**, por toda a análise estatística, pela paciência e prontidão em me auxiliar.

Ao **Dr<sup>o</sup> Armando Schubach**, pela colaboração com o projeto e por ser um exemplo de profissional e líder.

A **Dr<sup>a</sup> Fátima Conceição**, por todas as colaborações que fez ao projeto desde o início do seu desenvolvimento.

A **Lílian Dias**, pela disposição e prontidão em me ajudar com as lâminas.

A **Fernanda Morgado**, pelo grande auxílio com as fotos.

Aos que sempre torceram por mim, aos que passaram pela minha vida e me influenciaram positivamente. Sei que mesmo não sendo citados aqui, vocês estão felizes por mais esta etapa que foi cumprida.

“Jamais considere seus estudos como uma  
obrigação, mas como uma oportunidade  
invejável para aprender a conhecer a  
influência libertadora da beleza do reino do  
espírito, para seu próprio prazer pessoal e  
para proveito da comunidade à qual seu  
futuro trabalho pertencer”

(Albert Einstein)

Mello, C.X. **Comparação dos procedimentos de "imprint" e escarificação no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.** Rio de Janeiro, 2011 86 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, causada por parasitas do gênero *Leishmania*, que apresenta características complexas em diferentes aspectos. O diagnóstico, sempre que possível, deve ser feito com base em evidências epidemiológicas, aspecto clínico e exames laboratoriais. Para pesquisa direta do parasito, são utilizados os procedimentos de escarificação e "imprint", sendo a escarificação o método mais rápido, de menor custo e de fácil execução. Baseado nas características dos exames diretos para a confirmação dos casos de LTA, o Ministério da Saúde tem incentivado a implantação do procedimento de escarificação em todos os laboratórios centrais de saúde pública, sendo importantes tanto o conhecimento dos parâmetros de acurácia deste método quanto a padronização relacionada a forma de coleta e leitura, para que possa ser aplicado de forma uniformizada em todo o Brasil. Neste estudo, objetivamos avaliar a sensibilidade dos métodos diretos ("imprint" e escarificação), comparados com o teste padrão de referência (cultura). Além disso, buscamos estabelecer critérios de coleta e leitura com fins de uniformização do método para propor sua aplicação em diferentes regiões brasileiras. A população do estudo foi constituída de 110 pacientes com suspeita clínica de LTA que foram atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish/IPEC/Fiocruz) para avaliação clínica e coleta das amostras. Dentre os 110 pacientes analisados 40 foram confirmados com LTA. O "imprint" foi positivo em 28 pacientes conferindo sensibilidade de 70%, a escarificação realizada em borda externa foi positiva em 17 pacientes e em borda interna em 25 alcançando sensibilidade de 42,5% e 62,5% respectivamente. Além de mais sensível o material obtido da borda interna da lesão apresentou uma maior quantidade de células brancas e menos hemácias facilitando a leitura da lâmina. Os parâmetros de acurácia encontrados para os métodos diretos foram satisfatórios demonstrando que essas metodologias podem ser implantadas em todo o Brasil para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.

**Palavras-chave:** 1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Exame direto. 3. Escarificação 4. "Imprint". 5. Diagnóstico.

Mello, C.X. Comparison of procedures for "Imprint" and scraping in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. Rio de Janeiro, 2010 86 f. Dissertation [Masters Degree in Clinical Research in Infectious Diseases] Institute of Clinical Research Evandro Chagas.

### ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, which has complex characteristics in different aspects. The diagnosis, whenever possible, should be based on epidemiological evidence, clinical aspect and laboratory tests. Imprint and scraping procedures are used for direct detection of the parasite. Scraping is the quickest, low-cost and easy to conduct. Based on the characteristics of direct examination for the confirmation of ATL cases, the Brazilian Ministry of Health has encouraged the implementation of the scraping procedure in all Central public health laboratories. Thus the knowledge of the accuracy parameters of this procedure and the standardization of collection and reading methods are important for its application in a uniform manner throughout Brazil. In this study, we aimed to evaluate the sensitivity of direct methods (imprint and scraping), compared with the reference standard test (culture). Besides, we sought to establish collection and reading criteria with the purpose of standardizing the method to propose its application in different Brazilian regions. The study population comprised 110 patients with clinical suspicion of ATL who were treated at the Laboratory of Leishmaniasis Surveillance (VigiLeish/IPEC/Fiocruz) for clinical evaluation and sample collection. Among the 110 patients studied, 40 were confirmed with ATL. The imprint was positive in 28 patients granting sensitivity of 70%, scraping conducted in the outer edge was positive in 17 patients and in the inner edge in 25, reaching sensitivity of 42.5% and 62.5% respectively. The material obtained from the inner edge of the lesion was more sensitive and presented a larger amount of white cells and lesser red cells, favoring slide reading. Accuracy parameters found for the direct methods were satisfactory showing that they may be implemented in all Brazilian regions for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis.

**Keywords:** 1. American tegumentary leishmaniasis 2. Direct examination. 3. Scraping 4. Imprint 5. Diagnosis.

## LISTA DE QUADROS, TABELAS E ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Valores de sensibilidade de técnicas utilizadas para o diagnóstico da LTA em diferentes estudos .....	12
Tabela 1 -	Variáveis avaliadas no grupo total de pacientes estudados (GT;n=110) e pacientes com diagnóstico de leishmaniose (GL; n=40), atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010) .....	24
Tabela 2 -	Resultados laboratoriais dos métodos parasitológicos (cultura, "imprint" e escarificação) dos 40 pacientes confirmados com leishmaniose pelo isolamento em cultura atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010).....	28
Tabela 3 -	Relação entre as áreas examinadas e a positividade para os exames diretos (imprint, escarificação em BI e BE) em um grupo de pacientes com exame direto positivo (imprint ou escarificação) atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010).....	30
Tabela 4 -	Sensibilidade, concordância simples, Kappa, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) para as técnicas de imprint e escarificação em borda externa (BE) e borda interna (BI) da lesão em 110 pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010).....	30
Figura 1 -	Cartão de escala análoga visual de dor para indicação, pelo paciente, da intensidade de dor durante o procedimento de escarificação realizado em borda externa e interna da lesão (CFDIS Association of America, 2010).....	18
Figura 2 -	Representação esquemática da lâmina de microscopia, com 12 áreas demarcadas (caselas) utilizadas para confecção dos exames diretos (imprint e escarificação). Cada área possui 6mm e corresponde a 250 campos microscópicos (x1000)....	18
Figura 3 -	Representação esquemática do local da lesão onde foram realizados os procedimentos de escarificação em borda externa (BE) e interna (BI) e de realização da biópsia para cultura e o "imprint" .....	19
Figura 4 -	a - Lesão ulcerada em coxa direita de paciente atendido no Laboratório Vigileish/IPEC, FIOCRUZ, RJ. b – Inúmeras estruturas fúngicas elipsóides e arredondadas, localizadas dentro de leucócito observadas em lâminas de exame direto coradas pela técnica de Giemsa (x1000).....	26
Figura 5 -	a - Extensa úlcera localizada na perna direita de paciente atendida no laboratório Vigileish/IPEC, FIOCRUZ, RJ. b, c e d: estruturas elípticas, apresentando halo transparente ao redor, observadas em lâminas de exame direto (x1000). .....	27
Figura 6 -	Aspecto geral de uma lâmina de escarificação, após coloração pelo Giemsa realizada em borda externa (a) e interna (b) da lesão (400X). .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

- BI** – Borda interna da lesão  
**BE** – Borda externa da lesão  
**CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa  
**DNA** – Ácido desoxirribonucléico  
**ELISA** – (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Ensaio imunoenzimático indireto  
**FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz  
**GL** – Grupo de pacientes confirmados com leishmaniose  
**GT** - Grupo total de pacientes incluídos no estudo  
**IDRM** – Intradermorreação de Montenegro  
**IPEC** – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
**kDNA** – DNA do cinetoplasto  
**LACEN** – Laboratório Central de Saúde Pública  
**LC** – Leishmaniose cutânea  
**LSSP-PCR** – Reação em cadeia da polimerase de baixa estringência com um único primer específico  
**LTA** – Leishmaniose tegumentar americana  
**LT** – Leishmaniose tegumentar  
**LV** – Leishmaniose visceral  
**µg** – Micrograma  
**mL** – Mililitro  
**Mg** – Miligrama  
**NNN** – Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal  
**PCR** – Reação em Cadeia da Polimerase  
**RIFI** – Reação de imunofluorescência indireta  
**RPMI** – Roswell Park Memorial Institute  
**SFM**– Sistema fagocítico mononuclear  
**SPSS** – Pacote estatístico para as ciências sociais  
**U** – Unidades  
**Vigileish** – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2. O DIAGNÓSTICO .....	5
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
2.1. GERAL .....	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1. ASPECTOS ÉTICOS .....	16
3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	16
3.3. SUJEITOS DA PESQUISA .....	16
3.4. TAMANHO AMOSTRAL .....	17
3.5. CRITÉRIO DE ELEGIBILIDADE E SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	17
3.6. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO.....	17
3.6.1. <i>Escarificação</i> .....	17
3.6.2. <i>Cultura</i> .....	19
3.6.3. <i>"imprint"</i> .....	20
3.6.4. <i>Identificação dos parasitos isolados por eletroforese de isoenzimas (MLEE)</i> .....	21
3.6.5. <i>Critério de análise dos resultados</i> .....	21
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1. DADOS CLINICO-EPIDEMIOLÓGICOS .....	23
4.2. RESULTADOS LABORATORIAIS .....	25
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>37</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>46</b>
ANEXO 1 – TERMO DE OUTORGA RELACIONADO AO AUXILIO CONCEDIDO PELA FAPERJ AO PROJETO “COMPARAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE "IMPRINT" E ESCARIFICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA” - PROGRAMA APQ1/PROCESSO E26/ 110.892/2009.....	47
ANEXO 2 – DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS PARCIAIS DESTA DISSERTAÇÃO – XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL 2010, FOZ DO IGUAÇU-PR, BRASIL .....	49
ANEXO 3 – DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS PARCIAIS DESTA DISSERTAÇÃO – XLVII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL 2011, NATAL - RN, BRASIL .....	53
ANEXO 4 – PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS PARCIAIS DESTA DISSERTAÇÃO .....	556
ANEXO 5 – PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS DESTA DISSERTAÇÃO .....	578

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses são doenças infecciosas que acometem o homem e animais, representando um dos maiores problemas de saúde pública do mundo, ocupando lugar de destaque entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância (DESJEUX, 2001). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos ao homem e aos animais por insetos conhecidos como flebotomíneos, durante o repasto sanguíneo das fêmeas, dos gêneros *Phlebotomus*, responsáveis pela transmissão no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo.

Clinicamente, as leishmanioses, apresentam-se sob duas formas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), que ocorrem em diferentes ambientes, condicionadas a inúmeros fatores, entre eles a espécie do parasita. Ambas as formas ocorrem em todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, onde existe maior densidade de espécies vetoras. A Organização Mundial da Saúde estima que 12 milhões de pessoas estejam infectadas atualmente, com cerca de 1-2 milhões de novos casos a cada ano, além dos 350 milhões de indivíduos que estão sob risco de adquirir a doença em 88 países ao redor do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2011).

O gênero *Leishmania* foi descrito por ROSS em 1903 e atualmente conta com inúmeras espécies descritas, algumas associadas à doença no homem. Os parasitos desse gênero estão classificados na ordem Kinetoplastida, que inclui protozoários com uma estrutura celular peculiar, denominada cinetoplasto, formado por uma complexa rede de DNA, contido em uma mitocôndria única. A família Trypanosomatidae destaca-se nesta ordem por conter agentes etiológicos responsáveis por importantes doenças nos seres humanos e animais, entre elas as

leishmanioses (STUART et al., 2008). Os parasitos do gênero *Leishmania* estão classificados nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (LAINSON et al., 1987), cujo ciclo biológico heteroxênico, compreende formas promastigotas e paramastigotas, flagelados que se desenvolvem no trato alimentar dos insetos vetores e formas amastigotas, sem flagelo livre, que parasitam células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado, multiplicando-se por divisão binária em ambos hospedeiros.

Nas Américas, a doença tegumentar é denominada de leishmaniose tegumentar americana (LTA) e está presente desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com nítido processo de expansão em todo o continente americano (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). No Brasil, a LTA é registrada em todos os estados da federação, associada a sete espécies de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainson*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *L.(L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). *Leishmania (V.) braziliensis* é a espécie mais prevalente no Brasil e responsável pela maioria dos casos de LTA, com exceção da Amazônia. É composta por populações que apresentam elevada variabilidade genética e causam, predominantemente, lesões cutâneas e em menor proporção, lesões mucosas.

As manifestações clínicas da LTA apresentam amplo espectro, que pode ser um reflexo da complexa interação entre a resposta imunológica do paciente e as características genéticas das espécies envolvidas na infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Devido à complexidade clínica, alguns autores sugerem a classificação da LTA em grupos e subgrupo; considerando diferentes abordagens, Marzochi & Marzochi (1994) classificaram a doença tegumentar sob duas formas: leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa e respectivas apresentações clínicas.

A úlcera típica da leishmaniose cutânea é única, arredondada, indolor, medindo até alguns centímetros, base infiltrada e endurecida, bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas, fundo granuloso e avermelhado, e localizada. A lesão geralmente se inicia com um eritema no local da picada do flebotomíneo, em áreas expostas do corpo mais acessíveis aos vetores, onde posteriormente se desenvolve uma pápula e então um nódulo que tende a ulcerar em cerca de duas semanas a dois meses. A infecção secundária pode causar dor local e produzir modificações no aspecto clássico da lesão, que por sua vez também, podem se apresentar de outras formas, como pápulas, placas, verrucosa, eczematóide, entre outras (VEGA-LÓPEZ, 2003). Lesões

múltiplas são descritas, associadas a diversas picadas do vetor ou a disseminação em indivíduos com baixa imunidade. Lesões satélites lembrando esporotricose também têm sido observadas. (MARKLE & MAKHOUL, 2004). Tal diversidade de manifestações clínicas deve ser considerada no diagnóstico diferencial com outras doenças como a sífilis, hanseníase, paracoccidiodomicose, sarcoidose, cromoblastomicose, úlceras decorrentes da anemia falciforme, piodermites, tumores, vasculites, tuberculose, esporotricose, etc. (MARKLE & MAKHOUL, 2004).

O estabelecimento da infecção primária e o curso da doença dependem de inúmeros fatores, entre eles a espécie associada e o estado imunológico do indivíduo infectado. Dependendo da resposta imune mediada pelas células T, os indivíduos podem variar de um estado assintomático a diferentes graus de susceptibilidade à infecção. A forma cutânea localizada se encontra no centro deste espectro e é mantida por uma resposta imune Th1 que confere resistência contra a infecção e favorece os resultados do tratamento com antimonial. Nos pólos deste espectro estão a leishmaniose mucosa no pólo hiperérgico e a leishmaniose difusa no pólo anérgico (SILVEIRA et al., 2008).

A leishmaniose mucosa se caracteriza por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores e possui também diferentes classificações, de acordo com o quadro clínico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Classicamente ocorre anos após o surgimento da lesão cutânea, sugerindo uma possível disseminação dos parasitas por via hemática, embora possa ocorrer de forma primária ou concomitante a lesões cutâneas (SILVEIRA et al., 2008).

A possibilidade da persistência parasitária após a cura clínica é um fato que tem sido muito explorado ultimamente (MENDONÇA et al., 2004, VERGEL et al., 2006). Fatos como reativação espontânea das lesões (WEIGLE et al., 1985); transmissão por transplante de órgãos (Golino et al. 1992); casos em pacientes imunodeprimidos (DA-CRUZ et al., 1992) e encontro do parasita em lesões cicatrizadas por longos períodos (SCHUBACH et al., 1998; SCHUBACH et al., 2001), sugerem que a cura da LTA possa vir a ocorrer do equilíbrio entre os parasitos e hospedeiro. Os fatores que levam a evoluções diferentes (cura espontânea, persistência da lesão, recidivas, desenvolvimento da forma mucosa) ainda são um grande desafio para os pesquisadores.

Tratadas ou não, as úlceras cutâneas tenderiam à cura com formação de cicatrizes (MARSDEN et al., 1984). Tais cicatrizes típicas seriam atróficas; lisas; brilhantes; glabras; deprimidas; arredondadas; com a presença de raias fibrosas centrais e áreas de hipo e de hiperpigmentação.

O tratamento das leishmanioses, também é mais um desafio, pois conta com poucas opções de escolha. Os antimoniais pentavalentes foram introduzidos no tratamento das leishmanioses na década de 40 e constituem, até então, as drogas de primeira escolha, por recomendação do Ministério da Saúde brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Apesar da eficácia dos antimoniais, observado na maioria dos casos, relatos de recidivas e de falha terapêutica têm sido descritos, motivando estudos relacionados, principalmente, aos aspectos imunológicos do hospedeiro e à variabilidade genética dos parasitas (GOTO & LINDOSO, 2010). O mecanismo de ação não é bem conhecido, mas sabe-se que o fármaco inibe a atividade das vias glicolítica e de oxidação dos ácidos graxos do parasito nas formas amastigotas. (GOTO & LINDOSO, 2010). Embora eficazes, geram uma grande quantidade de efeitos colaterais incluindo artralgia, fadiga, enjôo, elevação dos níveis das enzimas hepáticas, anormalidades no eletrocardiograma, entre outros. Esquemas utilizando baixa dose do medicamento, 5mg/Kg/dia ao invés de 20 mg/Kg/dia, como preconiza o ministério da saúde brasileiro, tem sido avaliados alcançando bons resultados (OLIVEIRA-NETO et al., 1997; SCHUBACH et al., 1998)

Os padrões epidemiológicos da LTA variam de acordo com as características da região geográfica, das espécies de *Leishmania* circulantes e do envolvimento dos vetores e reservatórios. A prevalência da infecção humana também varia em função dos diferentes padrões. Tradicionalmente, a LTA era classificada como uma zoonose que acometia acidentalmente o homem, quando este entrava em contato com a floresta primária. Entretanto, ao longo dos anos, esse padrão foi sendo modificado, devido à multiplicidade de fatores que envolvem a cadeia epidemiológica de transmissão (LAINSON et al. 1987).

No Brasil, segundo o Manual do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010), atualmente admite-se a ocorrência de três padrões epidemiológicos distintos da LTA, que compreende: 1) perfil silvestre, onde a transmissão ocorre em áreas de vegetação primária, 2) perfil ocupacional ou de lazer, no qual a transmissão está associada a atividades de exploração da floresta e ao desenvolvimento de atividades agropecuárias e de ecoturismo e, 3) perfil rural ou

periurbano, que ocorre em áreas urbanas e periurbanas, onde houve adaptação do vetor nestes ambientes, com o possível envolvimento de animais domésticos e do próprio homem no ciclo de transmissão (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994).

O controle da LTA é extremamente complexo e requer estratégias distintas e adequadas ao contexto epidemiológico de cada região, devendo considerar diversos fatores, desde a espécie do parasita, o envolvimento de animais domésticos e a fauna flebotomínica, o que torna o controle e o estudo da doença tarefas igualmente difíceis. A expansão geográfica da doença, observada em diferentes regiões do mundo, é um reflexo dessa complexidade.

No Brasil, o controle está pautado na investigação e no conhecimento dos aspectos epidemiológicos e de seus determinantes para que ações específicas sejam então desencadeadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010)

## 1.2.O DIAGNÓSTICO

Devido às características imunobiológicas e ao grande espectro de manifestações clínicas apresentadas pela LTA, o seu diagnóstico nem sempre é uma tarefa fácil. Quando baseado somente em aspectos clínicos o diagnóstico tem baixa exatidão já que outras infecções mimetizam lesões de LTA (LUZ et al., 2009). Dessa forma o diagnóstico deve, sempre que possível, estar apoiado nos exames laboratoriais, aspectos clínicos e evidências epidemiológicas.

Dentre as abordagens possíveis para o diagnóstico da LTA a intradermorreação de Montenegro (IDRM) possui alto valor presuntivo no diagnóstico da doença. Foi descrita em 1926 por MONTENEGRO com o objetivo de ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico da leishmaniose mucosa e se tornou um dos testes mais utilizados na rotina ambulatorial para o diagnóstico da forma cutânea. Esse teste induz reações de hipersensibilidade tardia uma vez que a resposta imune característica da LTA é predominantemente do tipo celular (CARVALHO et al., 1995). É realizada através da aplicação de 0,1 mL de antígeno na face anterior do antebraço com leitura após 48-72 horas sendo considerada positiva quando se detecta endureção igual ou superior a 5mm. A medida da endureção deve ser feita com utilização de caneta esferográfica de acordo com o método descrito por SOKAL (1975); com decalque em papel, que foi

posteriormente introduzido na rotina de leitura da reação e tem apresentado bons resultados além de permitir a documentação do resultado e controle de qualidade da técnica (FAGUNDES et al., 2010). Apesar de sua ampla utilização, a IDRM apresenta restrições por não discriminar doença de infecção e doença atual de progressa, podendo permanecer positiva mesmo após o tratamento além de apresentar resultados positivos em pacientes com outras patologias. Durante uma epidemia na cidade do Rio de Janeiro, DE LIMA BARROS et al, (2005) descreveram 52 casos de pacientes com esporotricose confirmada por isolamento de *Sporothrix schenckii* em cultura, que apresentaram IDRM positivo. Em pacientes com leishmaniose cutâneo-difusa e em imunodeprimidos, o resultado pode ser negativo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Foram observados processos de alergia, associados ao tipo de preservante utilizado no teste, acarretando resultados falso positivos, fato que levou o fabricante a trocar o thimerosal pelo fenol (FAGUNDES et al., 2003). Em casos recentes, com menos de um mês de evolução, a IDRM também pode apresentar resultados negativos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Devido ao seu baixo custo, simplicidade de execução e de leitura, em muitas regiões do país o diagnóstico da LTA é baseado, muitas vezes, somente neste método. Isso se torna um preocupante problema, uma vez que a IDRM, avaliada de forma isolada, pode não ser conclusiva para o caso, principalmente em regiões com sobreposição de áreas endêmicas para outras doenças como esporotricose, como no caso do Rio de Janeiro.

Semelhantemente à IDRM que tem seu fundamento na detecção de resposta imune celular ao parasito, os métodos sorológicos são baseados na detecção da resposta imune humoral, ou seja, de anticorpos anti-*Leishmania* no soro humano. Estes testes possuem alta sensibilidade, mas baixa especificidade, por conta disso existem controvérsias na literatura a respeito do valor dessas técnicas no diagnóstico da LTA. Entretanto, quando empregadas associadas a outros métodos, podem ser de grande utilidade. A limitação das ferramentas sorológicas está relacionada aos baixos níveis séricos de anticorpos específicos registrados na LTA e às frequentes reações cruzadas (GONTIJO & CARVALHO, 2003). As técnicas sorológicas podem ser utilizadas em diferentes abordagens como testes rápidos, imunodifusão, testes de aglutinação direta, ensaio imunoenzimático conhecido como ELISA e reação de fluorescência indireta (RIFI) (KAR, 1995; GOTO & LINDOSO, 2010), sendo estes dois últimos os mais utilizados como ferramentas auxiliares para o diagnóstico de LTA e acompanhamento de pacientes sob tratamento

(BARROSO-FREITAS, 2009). Apesar disso, não existe um teste de ELISA disponível comercialmente, ficando sua utilização restrita a centros de pesquisa. Com o objetivo de melhorar a sensibilidade e especificidade da técnica de ELISA, estudos têm avaliado o desempenho do teste utilizando diferentes frações antigênicas purificadas (BOUVIER et al., 1985; JENSEN et al., 1996; MONTOYA et al., 1997, REY-LADINO et al., 1997). Recentemente, frações obtidas de cepas infectivas de *L. braziliensis* foram avaliadas, pelo nosso grupo, obtendo bons parâmetros de acurácia para o diagnóstico da LTA (CATALDO et al., 2010.).

Com relação a avaliação do prognóstico dos pacientes durante o tratamento e após cura clínica, o ELISA tem se mostrado uma ferramenta de grande valor. Estudo realizado por nossa equipe, mostram que pacientes que sofreram recidiva apresentaram pequena redução da intensidade da reação após a cura clínica, seguida, a partir do sexto mês, por um aumento de intensidade das reações que atingiram patamares mais elevados na ocasião da recidiva. Comportamento contrário ao grupo de pacientes que se mantiveram com suas lesões cicatrizadas: sendo que neste último grupo, ao final de dois anos mais da metade tornaram-se não reatores e os outros fracamente reatores (MOUTA-CONFORT, 2009).

As técnicas moleculares, entre elas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vêm tendo cada vez mais aplicabilidade no campo do diagnóstico de várias doenças, entre elas a LTA, devido principalmente à elevada sensibilidade. A técnica procura reproduzir o que ocorre na natureza e consiste na amplificação “in vitro”, de forma exponencial, do material genômico do parasito e posterior visualização dos produtos amplificados em gel de agarose corado por brometo de etídio. Geralmente o alvo para realização de técnicas moleculares na identificação de parasitas do gênero *Leishmania* são regiões conservadas do DNA do cinetoplasto (KDNA). A PCR pode ser aplicada em uma grande variedade de amostras clínicas tanto humanas quanto de animais, sendo mais sensível que os métodos convencionais de diagnóstico (AL-JAWABREH et al., 2006; SHAHBAZI et al, 2008). Uma outra vantagem da PCR é possibilitar a diferenciação das espécies de *Leishmania* envolvida na infecção, que pode ser feito através da utilização de oligonucleotídeos específicos e do uso de enzimas de restrição (RODRIGUEZ et al., 1994; DE ANDRADE et al., 2006).

Apesar das inúmeras vantagens, a PCR ainda não é usada em larga escala no diagnóstico. É uma técnica que requer infraestrutura laboratorial adequada e insumos específicos de custo

bastante elevado, constituindo esta uma das desvantagens do método. Características como incapacidade de diferenciar infecção passada e atual, possibilidade de reações positivas na ausência da doença e a dificuldade de formulações de kits comerciais são outras desvantagens do método que restringem seu emprego na rotina laboratorial, sendo mais utilizada em instituições de pesquisa e universidades.

Atualmente, variações da PCR tradicional têm sido utilizadas, não só no campo do diagnóstico, mas também em inúmeras pesquisas envolvendo as leishmanioses. Novos alvos genômicos (ITS-PCR e spliced leader mini-exon PCR) (BENSOUNAN et al., 2006), o uso da PCR em tempo real (WORTMANN et al., 2005), que pode avaliar a carga parasitária e técnicas como a PCR multiplex (HARRIS et al, 1998) e a LSSP-PCR (BAPTISTA et al., 2009) tem sido muito exploradas nesse contexto.

O diagnóstico parasitológico é considerado de certeza ou definitivo, pois se baseia na evidenciação do parasita de forma direta ou indireta. Na LTA, confirmação parasitológica se faz necessária devido principalmente ao grande espectro de manifestações clínicas, que podem ser confundidas com outras doenças que possam causar lesões cutâneas.

Dentre os métodos parasitológicos, o exame histopatológico tem grande valor para o diagnóstico diferencial. Sob o ponto de vista histológico, as lesões de LTA apresentam reação inflamatória crônica granulomatosa, cujo infiltrado dérmico é constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos e histiócitos (SCHUBACH et al., 2001). Em muitas situações, devido à escassez parasitária e à retração tecidual induzida pelos fixadores reduzindo ainda mais o tamanho do parasito (DA-CRUZ & PIRMEZ, 2005) o método histopatológico é pouco sensível para o diagnóstico das leishmanioses.

O isolamento de *Leishmania* em cultura constitui uma das formas de pesquisa indireta, sendo considerado padrão de referência para o diagnóstico da doença, pois além de permitir a visualização do parasito, permite o isolamento e armazenamento deste para caracterização da espécie e utilização em estudos futuros. O isolamento em cultura consiste na inoculação de fragmentos de biópsia ou aspirado de lesão em meios de cultura específicos, que expostos a temperaturas adequadas, simulam condições do organismo do hospedeiro invertebrado, proporcionando a diferenciação e multiplicação do parasito, que é facilmente observado em exames a fresco por microscopia ótica. As amostras de *Leishmania* isoladas, tanto de pacientes

quanto de animais, são importantes para fins de vigilância epidemiológica, pois a caracterização destas permite o mapeamento das espécies e/ou variantes de espécies de *Leishmania* que circulam entre os hospedeiros humanos e animais envolvidos no ciclo de transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os meios de cultura geralmente utilizados para o isolamento e manutenção desses parasitos, são uma combinação de meio sólido NNN com uma fase líquida acrescida de soro fetal bovino. O meio NNN ou 3N's foi descrito em 1904 por NOVY E MCNEAL e modificado por Nicole em 1908 (apud HOCKMEYER et al., 1987), é composto por uma base de agar acrescido de sangue de coelho desfibrinado. A fase líquida pode ser composta por diversos meios de cultura líquidos, sendo os mais comuns o BHI (infusão de cérebro e coração; STEINDEL & GRIZARD, 2001), Senekjie's (WEIGLE et al., 1987), RPMI (Roswell Park Memorial Institute) (IHALAMULLA et al., 2005) ou meio Schneider (Schneider's Drosophila Medium; GOTO & LINDOSO, 2010) que é um dos mais ricos em nutrientes disponíveis no mercado e apontado como o meio que proporciona maior sensibilidade e o isolamento mais rápido do parasito (LIGHTNER et al., 1982).

O primeiro relato de isolamento de *Leishmania* em cultura foi feito por Rogers em 1904; em 1979, Hendricks e Wright usaram o meio Schneider pela primeira vez para o diagnóstico da LTA, e em 1981 foi a vez de Hockmeyer et al. utilizarem o mesmo meio de cultura para o diagnóstico da leishmaniose visceral. Por ser uma técnica parasitológica por definição, possui 100% de especificidade apresentando valores de sensibilidade variando de 47,1% (ROMERO et al., 1999) a 86,2% (SHABAZZI et al., 2008).

A sensibilidade da técnica aumenta quando são tomados cuidados técnicos na coleta, tais como desinfecção prévia da lesão, acondicionamento do fragmento em solução salina com antibiótico, transporte sob refrigeração e processamento do material em condições assépticas. Essas medidas diminuem a possibilidade de contaminação das culturas por bactérias e fungos, que dificultam o crescimento da *Leishmania* e conseqüentemente diminuem a possibilidade de isolamento (DA-CRUZ & PIRMEZ, 2005). Adicionalmente, se a lesão apresentar sinais de contaminação secundária, é importante suspender a biopsia e recomendar ao paciente que a lesão seja lavada abundantemente com água e sabão diariamente, durante uma semana. Nos casos com exsudato purulento é recomendado antibioticoterapia.

Visando diminuir o índice de contaminação secundária das culturas, o que inviabiliza o exame, as biópsias são colocadas em solução fisiológica contendo antibióticos associados (benzilpenicilina e estreptomicina) e um antifúngico (fluorocitosina), permanecendo nessa condição durante 24 horas em geladeira. Somente após esse período, as biopsias são semeadas nos meios de cultura, que também contêm antibióticos. Entretanto a concentração de antimicrobianos utilizada tem sido empírica e sem padronização (MÄSER et al., 2002), além de o uso de antifúngicos não ser difundido devido a relatos de inibição do crescimento do parasito (PALOMINO et al., 1983). Trabalhos prévios do nosso grupo têm mostrado que qualquer antimicrobiano utilizado em altas concentrações pode inibir o crescimento do parasito, entretanto a concentração de 200µg/mL de fluorocitosina e estreptomicina e 200U/mL de penicilina não exercem efeitos negativos no crescimento, se mostrando seguras para o uso em meio de cultura para isolamento de *Leishmania* (MELLO et al., 2010)

Além da possibilidade de contaminação das culturas, outro inconveniente deste método é a necessidade de infraestrutura laboratorial dispensada para sua realização, impedindo sua aplicação em regiões carentes como é o caso da maioria das regiões afetadas pela leishmaniose. Nesse contexto a evidenciação do parasito pela forma direta passa a ser a alternativa mais adequada.

A pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania* pode ser feita em material clínico obtido das lesões, através do procedimento de escarificação (NAIFF, 1996), por punção aspirativa (KASSI et al., 2004), pelo método de Tzanck (“slit skin smear”) (BENSOUSSAN et al., 2006; UL BARI & BER RAHMAN, 2006; DURDU et al., 2009), coleta com sonda dentária (“dental broach”) (GRIFFITHS & DUTZ, 1975; NAVIN, 1990) ou ainda em impressões com fragmentos de tecido (“imprint”). Todos os métodos citados empregam preparações em lâminas de vidro, fixadas e coradas por corantes derivados do Romanowsky para posterior visualização de formas amastigotas.

Apesar da literatura indicar baixa sensibilidade, os métodos diretos constituem alternativas poderosas para o diagnóstico da leishmaniose (RUOCCO et al., 2010). São métodos simples, rápidos, baratos e confiáveis para o diagnóstico de muitas doenças dermatológicas, quando realizado por mãos experientes (BRITO et al., 2009). Além disso, o procedimento é bem tolerado pelos pacientes por causar trauma ou desconforto insignificantes, podendo ser utilizado, e até

repetido se necessário, em crianças e em locais de topografia pouco acessível (RUOCCO et al., 2010). Os métodos diretos foram uma das primeiras abordagens a serem utilizadas no diagnóstico da leishmaniose (SILVA, 1915) e permanecem ainda como o método mais acessível para o diagnóstico definitivo da leishmaniose (RAMIREZ et al., 2000; MINISTÉRIO DA SAUDE, 2010).

Dentre os exames diretos, o procedimento de escarificação constitui um dos métodos mais simples e um dos mais antigos (SILVA, 1915). Consiste em pesquisar o parasita em material obtido de raspados das lesões, sem a necessidade de anestesia local. Algumas variações para obtenção de material para o exame direto são descritas. O método de Tzanck (SCHNEIDER, 2010) foi inicialmente utilizado para o diagnóstico de câncer de pele, herpes e dermatites e hoje é largamente utilizado nas doenças dermatológicas incluindo as leishmaniose. Para obtenção do material, realiza-se um corte de profundidade de cerca de 3mm na borda da lesão, sendo o raspado feito na superfície interna do corte. A coleta com *dental broach* é outra variação e emprega uma sonda dentária com extremidade semelhante a arame farpado que é inserida e retirada da borda da lesão com movimentos suaves de rotação, trazendo partículas de tecido, células e possíveis parasitas.

A sensibilidade dos métodos diretos, embora tida como baixa, quando comparado com a cultura, é muito variada e pode estar condicionada a inúmeros fatores, entre eles, a carga parasitária, a espécie de *Leishmania* envolvida, o tempo de evolução da lesão (RAMIREZ et al., 2000), sítio da lesão onde o parasito é pesquisado (RAMIREZ et al., 2000), qualidade do material coletado, o tipo de corante utilizado (CASTILLO & ROJAS, 1997), o tempo e o número de campos microscópicos examinados e a experiência do profissional que realiza o exame. (AL-JITAWI et al., 1995; BRUSTOLONI et al., 2007). Além disso, a falta de padronização do procedimento de escarificação para o diagnóstico da LTA dificulta a comparação dos resultados entre os diferentes estudos, cuja literatura relata valores de sensibilidade que variam de 32,7% (WEIGLE et al., 1987) a 90,4% (RAMIREZ et al, 2000). O quadro 1 apresenta diversos estudos da comparação da sensibilidade de diferentes técnicas utilizadas para o diagnóstico da LTA.

**Quadro 1** – Sensibilidade de técnicas utilizadas para o diagnóstico da LTA reportada em diferentes estudos. (Valores expressos em percentuais).

Técnica padrão de referência (no estudo)	Técnicas utilizadas								Referência	
	Métodos diretos				Cultura		HE	PCR		
	Método de Tzanck	Sonda dentária	Escarificação	Escarificação BI e "imprint"	Imprint	Aspirado				Biópsia
Quadro clínico	-	81,0	-	-	-	-	-	-	-	Griffiths; Dutz, 1974
Qualquer técnica parasitológica	32,7/BL	-	-	-	27,9	85,0	72,7	21,4	-	Weigle et al., 1987
Quadro clínico	40,0/BL	31,0/BL 37,0/CL	31/BL 40/CL	-	-	-	40,0	-	-	Navin et al., 1990
Quadro clínico	-	-	34,8/BL	-	-	41,3	-	-	-	Al jitawi et al., 1993
IDRM (+)	-	-	-	-	63,0	-	43,0*	-	97,0**	Rodriguez et al., 1994
Cultura ou "Imprint"	-	-	-	-	72,4	-	62,0	-	-	Bahamdan et al., 1996
Quadro clínico	55,0/BL	-	-	-	48,0	-	-	76,0	86,0**	Andersen et al., 1996
Escarificação BI ou "imprint"	-	-	-	59,4	-	-	-	-	-	Silveira et al., 1999
Qualquer técnica utilizada no estudo	78,3/BL 90,4/CL	-	-	-	-	67,5	-	64,3/ BL	80,8/CL** 57,7/BL**	Ramirez et al., 2000
Cultura, escarificação ou PCR	-	-	69,0/BL 85,0/CL	-	-	69,0	-	-	58/BL** 81/CL**	Ramirez et al., 2002
Cultura, exame direto ou histopatológico	-	-	-	65,0	-	-	84,0	82,0	100,0**	Faber et al., 2003
Cultura, exame direto ou 2 PCR's positivos	74,4	-	-	-	-	-	62,8	-	98,7**	Bessouan et al., 2006
Qualquer técnica utilizada no estudo	-	-	-	-	79,3	-	86,2	-	98,8***	Shabazzi et al., 2008
IDRM ou "imprint"	-	-	-	-	63,1	-	69,7	-	80,0**	Luz et al., 2009

(-): Não avaliado no estudo, BL: Exame realizado na borda da lesão, CL: Exame realizado no centro da lesão, IDRM: Intraderno reação de montenegro, Escarificação BI: Escarificação em borda interna da lesão, HE: Exame histopatológico, \* Em 30% das culturas houve crescimento de fungos e bactérias, \*\* Alvo molecular: KDNA, \*\*\* Alvo molecular: Região ITS (Internal transcribed space).

Dentre os fatores que afetam a sensibilidade o número de campos microscópicos examinados é um dos que possuem maior influência. Por conta disso a Organização Mundial de Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999) sugere a leitura de 1000 campos microscópicos em aumento de 1000 vezes antes da liberação do resultado negativo em caso de suspeita de leishmaniose visceral, entretanto para amostras de lesão cutânea não existem orientações. O aumento da sensibilidade proporcional ao número de campos é tão significativo que NAVIN et al.(1990), utilizando a leitura de 5 lâminas conseguiu identificar todos os casos positivos pelo isolamento em cultura. Outro fator que também influencia na sensibilidade dos exames diretos está relacionado ao sítio da lesão onde é realizada a coleta do material. Diferentes estudos têm abordado esse parâmetro realizando coleta em diferentes locais da lesão como borda interna, borda externa e centro da lesão obtendo variações nos valores de sensibilidade (RAMIREZ et al.; 2000; ROBINSON et al., 2002; NAVIN et al., 1990). O manual de vigilância em leishmanioses do Ministério da Saúde brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010) recomenda a realização da escarificação na borda interna da lesão, ainda assim, são observadas variações na forma de coleta em diferentes regiões do país.

Apesar de ser um método de simples aplicação, recursos humanos treinados e leituras cuidadosas são extremamente importantes, pois outros microrganismos podem estar presentes na lesão, seja como contaminantes, seja como agente etiológico de outras doenças, podendo gerar confusão no diagnóstico. Estruturas leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* (SÃO THIAGO et al.,1998), de *Candida* sp e de *Sporothrix schenckii* podem ser confundidas com formas amastigotas de *Leishmania* sp por um microscopista pouco experiente (MELLO et al., 2011).

Tendo em vista os dados apresentados, o exame direto pode ser considerado um método de grande aplicabilidade em áreas carentes de recursos laboratoriais. Por essa razão, o Ministério da Saúde tem incentivado todos os laboratórios centrais de saúde pública (LACENS) a implantarem o método da escarificação para o diagnóstico da LTA, principalmente por não necessitar de intervenção cirúrgica para coleta do material.

O Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (VigiLeish/IPEC/Fiocruz) integra a rede de Laboratórios de Referência do Ministério da Saúde e vem participando de atividades de capacitação de profissionais dos LACENS por todo o país. Tal capacitação inclui

treinamento na técnica de escarificação de borda da lesão, confecção das lâminas, fixação, coloração pelo método de Giemsa e leitura do exame direto. Nestas ocasiões, alguns questionamentos surgem com frequência: Existe diferença entre o material obtido da borda interna ou da borda externa da lesão? Qual a quantidade de material que deve ser coletado? O exame de mais de uma lâmina melhora a sensibilidade da técnica? O procedimento de “imprint” é tão sensível quanto a escarificação? Embora seja provável que a ausência de padronização para o procedimento da escarificação possa interferir na qualidade do diagnóstico, não encontramos na literatura nenhuma avaliação sistemática comparando diferentes formas de coleta e seu impacto no desempenho da técnica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1.GERAL

Padronizar a técnica de escarificação e avaliar a sensibilidade dos exames parasitológicos diretos, “imprint” e escarificação, para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana, utilizando como padrão de referência o isolamento em cultura.

### 2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar e comparar a sensibilidade do método de escarificação, realizado em dois locais da lesão (borda interna e externa) e do “imprint”, tendo como padrão de referência o isolamento em cultura;
- 2) Avaliar o procedimento de escarificação com relação à facilidade de coleta do material e à qualidade dos esfregaços obtidos na borda interna e externa da lesão;
- 3) Avaliar e comparar a frequência de sangramento e intensidade de dor no procedimento de escarificação realizado na borda interna e na borda externa da lesão;
- 4) Determinar a sensibilidade dos exames diretos (“imprint” e escarificação) em relação ao número de campos microscópicos lidos;
- 5) Padronizar o procedimento de escarificação, propondo uma uniformização do método, relacionado à forma de coleta e leitura microscópica;
- 6) Identificar, por eletroforese de isoenzimas, os parasitos isolados em cultura.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo possui aprovação do CEP/IPEC/FIOCRUZ sob o número de protocolo: 0033.0.009.000-09 e integra um projeto maior intitulado: “Estudo para sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz”. Todos os pacientes foram informados sobre o propósito da investigação e manifestaram sua aceitação em participar do estudo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

#### **3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Estudo diagnóstico seccional, sem repetições, para determinação da sensibilidade dos exames diretos (escarificação e “imprint”) frente ao padrão de referência (isolamento em cultura). A população do estudo foi constituída por pacientes atendidos no laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish)/IPEC/Fiocruz.

#### **3.3. SUJEITOS DA PESQUISA**

A população do estudo foi constituída por pacientes que procuraram atendimento no ambulatório do VigiLeish/IPEC/Fiocruz, no período de 2009-2010.

### 3.4.TAMANHO AMOSTRAL

Para a comparação da diferença entre as sensibilidades dos três testes diagnósticos (imprint, escarificação da borda externa e escarificação da borda interna) foram realizados dois diferentes cálculos amostrais utilizando o programa estatístico “R” 2.12.1. Em ambos, o número amostral de 102 lesões foi suficiente para afirmar diferenças entre as sensibilidades, ao nível de significância de 5% e poder de 80%. Em ambos os cálculos foram considerados que os dados são pareados e que existe uma concordância na positividade entre os testes.

### 3.5.CRITÉRIO DE ELEGIBILIDADE E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram considerados elegíveis todos os pacientes acima de 10 anos, apresentando lesões cutâneas ulceradas, atendidos no ambulatório do VigiLeish/IPEC/Fiocruz, no período compreendido entre 2009-2010, que tiveram coletadas amostras clínicas para os procedimentos de isolamento em cultura, “imprint” e escarificação, em dois locais da lesão, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram desconsiderados aqueles que por qualquer motivo, não tenham coletado material para todos os métodos.

### 3.6.PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO

#### 3.6.1. ESCARIFICAÇÃO

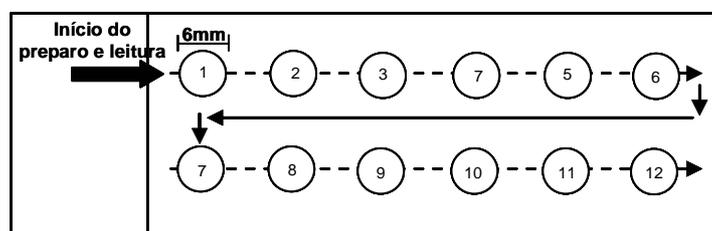
Este procedimento foi realizado em ambiente ambulatorial, por profissional treinado. Inicialmente fez-se anti-sepsia com álcool etílico 70% (Rioquímica, São Paulo, Brasil) na lesão. A escarificação foi realizada na área mais infiltrada da borda da lesão utilizando-se lâmina de bisturi de ponta fina (nº 11) (Embramed, São Paulo, Brasil). O procedimento foi realizado em duas etapas considerando sempre o mesmo local da lesão: primeiro foi confeccionado uma lâmina com material obtido da borda externa (BE) da lesão e posteriormente outra, confeccionada com material obtido da

borda interna (BI). O material obtido foi distendido na lâmina de vidro, realizando-se pequenos esfregaços sem sobreposição obedecendo a uma sequência pré-estabelecida. Ao final de cada etapa do procedimento de escarificação, realizado em BE e BI, o paciente indicou o nível de dor, através de um cartão de escala análoga visual (CFDIS Association of America, 2010) que variou de 0 a 10 pontos (Figura 1). Considerou-se o intervalo de 0-1 como “nenhuma” intensidade de dor; de 2-3 “leve”; de 4-5 “moderada”, 6-7 “intensa” e 8-10 “insuportável”. O procedimento foi realizado sem hemostasia em ambos os locais e a ocorrência de sangramento foi registrada, sendo considerada positiva quando houve a necessidade de interromper o procedimento por duas vezes para estancar o sangramento com auxílio de compressão com gaze.

Nenhuma		Leve		Moderada		Intensa		Insuportável		
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**Figura 1** - Cartão de escala análoga visual de dor para indicação, pelo paciente, da intensidade de dor durante o procedimento de escarificação realizado em borda externa e interna da lesão (CFDIS Association of America, 2010)

Para preparação das lâminas para os exames diretos (escarificação e “imprint”), foram utilizadas lâminas de microscopia com áreas demarcadas. Cada área (casela) possui 250 campos (aumento de 1000 vezes) totalizando 3000 campos por lâmina. As lâminas utilizadas foram previamente limpas e desgorduradas. A confecção de ambos os procedimentos foi realizada considerando a sequência apresentada na Figura 2.



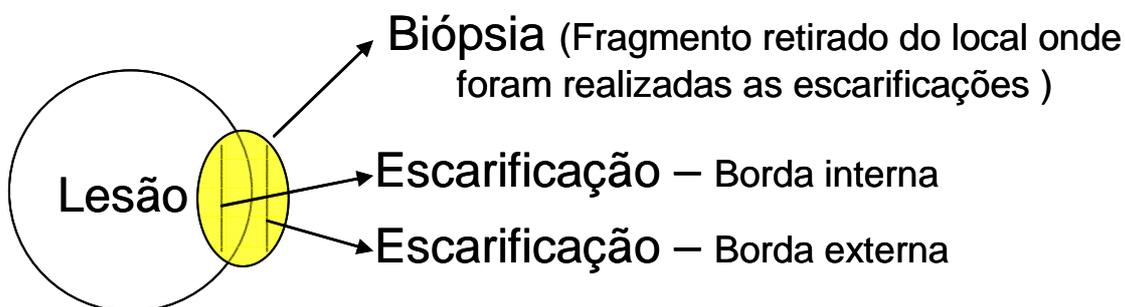
**Figura 2** - Representação esquemática da lâmina de microscopia, com 12 áreas demarcadas (caselas) utilizadas para confecção dos exames diretos (imprint e escarificação). Cada área possui 6mm e corresponde a 250 campos microscópicos (x1000).

Após confecção das lâminas, as mesmas foram encaminhadas ao laboratório em caixas apropriadas e imediatamente submetidas à fixação, empregando álcool metílico P.A. (Vetec Duque de Caxias, Brasil) durante 5 minutos. Quando completamente secas, as lâminas foram coradas pelo método de Giemsa (Merck, Darmstadi, Germany) considerando a diluição de duas gotas do corante para cada 1 mL de tampão fosfato (pH=7,2) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e imersas nessa solução por 20 minutos com posterior lavagem em água corrente.

A leitura das lâminas foi feita com objetiva de imersão (x1000) seguindo a mesma sequência indicada no esquema da figura 2, examinando-se todos os campos das áreas demarcadas da lâmina e registrando-se a casela onde foi encontrado o primeiro parasito.

### 3.6.2. CULTURA

A biópsia da lesão, de responsabilidade do médico foi realizada após o procedimento de escarificação, considerando o mesmo local que foi escarificado. Foi mantida a mesma lesão para todos os métodos propostos neste estudo. A Figura 3 mostra, em representação esquemática, os locais da lesão onde foram realizados os procedimentos de escarificação e da biópsia .



**Figura 3** - Representação esquemática do local da lesão onde foram realizados os procedimentos de escarificação em borda externa (BE) e interna (BI) e de realização da biópsia para cultura e o “imprint”.

Após o procedimento de escarificação, foi realizada nova anti-sepsia com álcool etílico 70% (Rioquímica, São Paulo, Brasil) e anestesia local com lidocaína 2% (Hypofarma, Minas Gerais, Brasil) e, com auxílio de um “punch”, foi retirado um fragmento de cerca de 5-6 mm de diâmetro, que foi dividido em duas partes, sendo uma utilizada para realização do “imprint” e outra para o isolamento em cultura.

O fragmento para o isolamento em cultura foi imediatamente colocado em solução fisiológica (NaCl 0,85%) (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) contendo o antifúngico 5'fluorocytosine (150µg/mL) (Sigma, Steinhein, Germany) e os antibióticos penicilina (200U/mL) e estreptomicina (200µgmL) (Sigma, Steinhein, Germany) onde permaneceu por 24 horas a temperatura de 4°C. Após esse período, o fragmento foi seccionado e transferido assepticamente para três tubos contendo meio de cultura bifásico Novy, MacNeal, Nicolle (NNN) acrescido de meio Schneider's (Sigma, Steinhein, Germany) suplementado com 10% de soro fetal bovino -SFB- (LAC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e submetidos a temperatura de 26-28°C em estufa BOD (FANEN , Brasil). Os exames das culturas foram realizados a fresco semanalmente durante 30 dias. As amostras isoladas foram criopreservadas e posteriormente identificadas por eletroforese de isoenzimas.

### **3.6.3. "IMPRINT"**

A impressão em lâmina foi realizada imediatamente após a biópsia. Se necessário, após a excisão cirúrgica, o fragmento foi ligeiramente pressionado sobre uma gaze ou papel de filtro para retirada do excesso de sangue ou exsudato. Com auxílio de uma pinça, realizou-se compressão (“carimbo”) do fragmento sobre cada casela da lâmina, mantendo-se a mesma sequência utilizada para o procedimento de escarificação. Os movimentos de aposição do fragmento sobre a lâmina foram feitos delicadamente sem sobreposição. A fixação, coloração e exame das lâminas foram realizados como descrito no item 3.6.1.

### **3.6.4. IDENTIFICAÇÃO DOS PARASITOS ISOLADOS POR ELETROFORESE DE ISOENZIMAS (MLEE)**

Todos os isolados obtidos durante o estudo foram armazenados no Banco de Amostras do VigiLeish/IPEC/Fiocruz e analisados por eletroforese de enzimas. Para caracterização os isolados foram cultivados em meio apropriado para obtenção de cerca de  $10^9$  parasitas e, posteriormente submetidos a lavagens em tampão próprio, sob centrifugação até a obtenção de um sedimento que foi armazenado em botijões de nitrogênio líquido ( $N_2$ ) até a realização da técnica. Para a corrida eletroforética, foi preparado um gel de agarose Tipo V (Sigma, Steinhein, Germany) a 1%, em tampão, de acordo com a enzima estudada e colocado sobre um filme de poliestireno (Gel Bond – Amershan Bioscience, EUA) onde a amostra teste foi aplicada. Foram empregados seis sistemas enzimáticos: 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase, EC.1.1.1.43); GPI (fosfoglucose isomerase, EC.5.3.1.9) ; NH (nucleosídeo hidrolase, 2 loci, EC. 3.2.2.1); G6PDH (Glucose-6-fosfato desidrogenase, EC.1.1.1.49) e PGM (fosfoglucomutase, EC. 1.4.1.9) cuja metodologia foi baseada em protocolos já definidos na literatura (CUPOLILO et al., 1994). Amostras de referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) foram empregadas em todas as corridas eletroforéticas. A revelação da atividade enzimática das amostras foi feita colocando-se diretamente sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima, sendo a reação interrompida pela adição de ácido acético a 5% (Vetec, Duque de Caxias, Brasil). A mobilidade eletroforética das amostras foi comparada com o padrão das amostras de referência utilizadas nos ensaios.

### **3.6.5. CRITÉRIO DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**

As análises consideraram o grupo total de pacientes incluídos no estudo (GT) e o grupo de pacientes com diagnóstico final de leishmaniose (GL).

A análise exploratória dos dados foi realizada através de frequências das variáveis: diagnóstico final, local de moradia, sexo, número de lesões, tempo de evolução das lesões, localização das lesões, ocorrência de sangramento e intensidade de

dor para o procedimento de escarificação. A idade dos pacientes foi expressa através da média e desvio-padrão.

O teste exato de Fisher foi empregado na avaliação da associação entre a ocorrência de sangramento e o local da escarificação (BE e BI). Na avaliação entre tempo de evolução da lesão e o resultado do imprint e escarificação (positivo ou negativo) considerou-se apenas o grupo com leishmaniose (GL).

A comparação entre a intensidade de dor em BE e BI foi realizada através do teste não paramétrico de Wilcoxon.

Para determinar a positividade relacionada ao número de campos microscópicos examinados nos exames diretos, foi estabelecido como ponto de corte a área demarcada da lâmina onde foi encontrada a primeira forma amastigota. O total de casos positivos acumulados ( $N^{accum}$ ) em relação ao número de áreas demarcadas examinadas foi expresso em percentual (%) permitindo a determinação de um número mínimo de campos microscópicos a serem examinados.

Para avaliação da concordância entre os exames diretos ("imprint" e escarificação) e a cultura, empregou-se o teste kappa simples baseado nos critérios de Landis e Koch (LANDIS & KOCH, 1977) onde  $k \leq 0,20$  (concordância pobre);  $0,21 \leq k \leq 0,40$  (fraco);  $0,41 \leq k \leq 0,60$  (moderado);  $0,61 \leq k \leq 0,80$  (substancial) e  $k > 0,80$  (quase perfeita).

Os parâmetros de acurácia dos ensaios utilizados neste estudo: sensibilidade, especificidade, concordância simples, valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%) foram calculados através do software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 16.0. P-valores  $< 0,05$  indicaram associações estatisticamente significativas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1.DADOS CLINICO-EPIDEMIOLÓGICOS

Foram incluídos no estudo 110 pacientes com suspeita clínica de LTA atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas- IPEC, FIOCRUZ.

Noventa e oito (98%; n=108) dos pacientes residiam no estado do Rio de Janeiro, enquanto 2% (n=2) residiam no estado da Bahia e Maranhão. Dentre os residentes no estado do Rio de Janeiro, 57% (n=62) residiam no município do Rio de Janeiro e os outros 43% (n=38) foram oriundos dos demais municípios do estado.

Com relação ao diagnóstico final, 36,4% (n=40) dos pacientes analisados obtiveram diagnóstico de leishmaniose, 17,3% (n=19) diagnóstico de esporotricose, 16,4% (n=18) piодermite, 8,2% (n=9) úlcera de etiologia vascular, 13,5% (n=15) foram diagnosticados com outras patologias e 8,2% (n=9) não obtiveram diagnóstico (inconclusivo).

Dos 40 pacientes confirmados com LTA, 38 residiam no estado do Rio de Janeiro, 1 no estado do Maranhão e 1 na Bahia.

A idade média dos pacientes foi de  $39,9 \pm 3,5$  anos no grupo total (n=110), e de  $37,6 \pm 5,8$  anos dentre os pacientes com leishmaniose (n=40).

No grupo de pacientes com leishmaniose foi observado maior acometimento do sexo masculino e maior acometimento dos membros superiores e inferiores quando comparado ao grupo total de pacientes.

A tabela 1 apresenta as variáveis avaliadas no grupo total de pacientes estudados (GT;n=110) e pacientes com diagnóstico de leishmaniose (GL; n=40)

**Tabela 1** - Variáveis avaliadas no grupo total de pacientes estudados (GT;n=110) e pacientes com diagnóstico de leishmaniose (GL; n=40), atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010)

Variáveis	Resultados por grupo	
	GL (n=40) %(n)	GT (n=110) % (n)
<b>Sexo</b>		
Feminino	30,0 (12)	59,1 (65)
Masculino	70,0 (28)	40,9 (45)
<b>Número de lesões</b>		
1-3 lesões	85,0 (34)	92,8 (17)
Acima de 3 lesões	15,0 (6)	7,2 (8)
<b>Tempo de evolução das lesões</b>		
1-3 meses	65,0 (24)	62,7 (69)
Acima de 3 meses	35,0 (14)	36,4 (40)
Não informado	0	0,9 (1)
<b>Localização da lesão</b>		
Face/Pescoço	12,5 (5)	7,3 (8)
Braços	55,0 (22)	6,4 (7)
Pernas	25,0 (10)	34,5 (8)
Tronco	7,5 (3)	51,8 (57)
<b>Ocorrência de sangramento BE</b>		
Sim	70,0 (28)	58,2 (64)
Não	30,0 (12)	41,8 (46)
<b>Ocorrência de sangramento BI</b>		
Sim	30,0 (12)	25,0 (28)
Não	70,0 (28)	75,0 (82)
<b>Intensidade de dor BE</b>		
0-1	60,0 (66)	60,0 (24)
2-3	23,6 (26)	20,0 (8)
4-5	10,9 (11)	20,0 (8)
6-7	1,8 (2)	0
8-10	3,6 (4)	0
<b>Intensidade de dor BI</b>		
0-1	61 (55,5)	55,0 (22)
2-3	23 (20,9)	22,5 (9)
4-5	15 (13,7)	2,5 (1)
6-7	3,6 (4)	7,5 (3)
8-10	6,3 (7)	0

## 4.2.RESULTADOS LABORATORIAIS

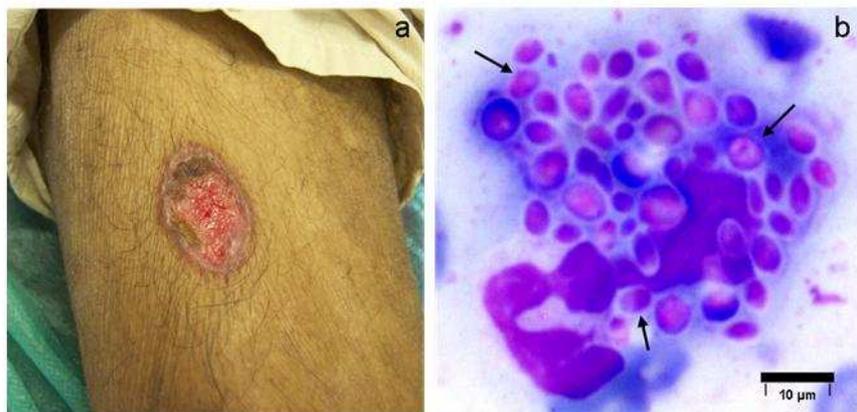
Dos 110 pacientes estudados, 40 apresentaram isolamento em meio de cultura de *Leishmania* sp., dos quais 34 foram positivos ao primeiro exame da cultura (7° dia) e 6 ao segundo exame (14° dia). Nenhum paciente apresentou exames positivos nas leituras realizadas no 3° ou 4° exames (21° e 30° dia). Estes resultados podem ser observados na tabela 3.

Das 40 amostras de *Leishmania* sp. isoladas e analisadas pela técnica de isoenzimas, 39 apresentaram perfil eletroforético compatível com a cepa de referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e uma com a cepa referência *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) em todos os seis sistemas estudados.

A cultura de amostras de 15 pacientes apresentou crescimento de outros microorganismos, sendo em 14 amostras observado o crescimento de fungos e em uma amostra, crescimento de bactérias. Das 14 amostras com crescimento fúngico, dez foram enviadas ao laboratório de Micologia Médica (IPEC/FIOCRUZ), e em nove, foi confirmado a presença de *Sporotrix schenckii* e em uma amostra a presença de *Candida* sp. Quatro amostras não foram encaminhadas, uma vez que o crescimento fúngico demonstrou características visuais de possíveis contaminantes, sendo o diagnóstico de hanseníase virchoviana, esporotricose disseminada, úlcera de etiologia vascular e carcinoma espinocelular posteriormente confirmado nesses quatro pacientes.

Em dois dos 15 pacientes que tiveram a cultura contaminada pelo crescimento de fungos, foram visualizadas, nas lâminas para o exame direto, estruturas leveduriformes passíveis de confusão com formas amastigotas de *Leishmania*.

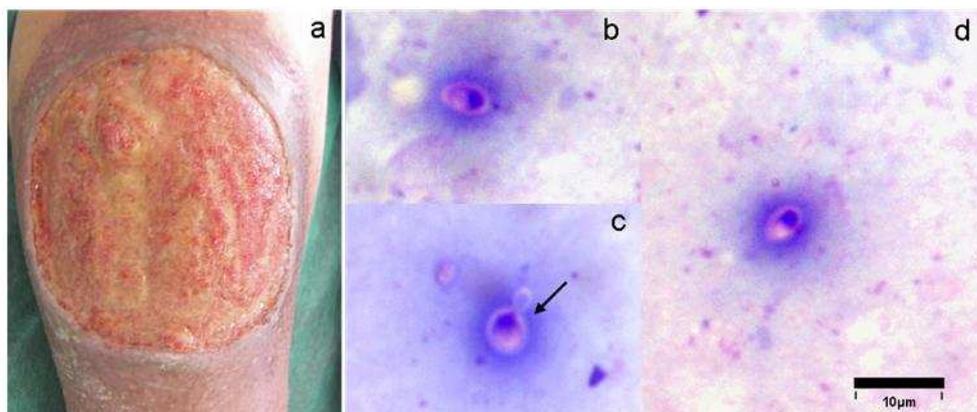
No primeiro caso, o paciente era do sexo masculino, 44 anos, HIV (+) e apresentou lesão na coxa, palato e pé esquerdo. Esse paciente foi posteriormente diagnosticado com esporotricose disseminada. A observação das lâminas de “imprint” e escarificação do material obtido da lesão da coxa revelou a presença de inúmeras estruturas elipsóides e arredondadas, localizadas no interior e no exterior de macrófagos. A figura 4 mostra a lesão de onde foram coletadas amostras para o exame direto (a) e as estruturas fungicas observadas no exame direto (b).



**Figura 4** - a - Lesão ulcerada em coxa direita de paciente HIV (+) com esporotricose atendido no Laboratório Vigileish/IPEC/FIOCRUZ. b – Inúmeras estruturas fúngicas elipsóides e arredondadas, localizadas dentro de leucócito observadas em lâminas de exame direto coradas pela técnica de Giemsa (x1000).

Embora semelhantes a formas amastigotas em tamanho e formato, tais estruturas não apresentavam cinetoplasto, característica fundamental para identificação dos parasitas do gênero *Leishmania*.

No segundo caso, o paciente era do sexo feminino 51 anos, com extensa úlcera localizada na perna direita, cujo diagnóstico de úlcera de estase foi dado pelo exame histopatológico. No exame direto, tanto das lâminas de “imprint” como de escarificação foram observadas estruturas elípticas, com halo transparente ao redor, A figura 5 mostra a lesão (a) de onde foram coletadas amostras para o exame direto e estruturas observadas ao microscópio (b, c, d).



**Figura 5** - a - Extensa úlcera localizada na perna direita de paciente com úlcera de estase atendida no laboratório Vigileish/IPEC/FIOCRUZ. b, c e d: estruturas elípticas, apresentando halo transparente ao redor, observadas em lâminas de exame direto (x1000).

Os resultados laboratoriais de confirmação dos pacientes com leishmaniose pelo isolamento em cultura podem ser observados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultados dos métodos parasitológicos (cultura, "imprint" e escarificação) dos 40 pacientes confirmados com leishmaniose pelo isolamento em cultura atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010).

Código da amostra	Cultura	Exame direto		
		"imprint"	Escarificação	
			BE	BI
1	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
3	Positivo 1ºexame**	Positivo	Positivo	Positivo
9	Positivo 2ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
11	Positivo 1ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
17	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
20	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
24	Positivo 1ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
31	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo
32	Positivo 1ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
33	Positivo 2ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
38	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
40	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
41	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Negativo
47	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo
50	Positivo 2ºexame*	Positivo	Negativo	Negativo
51	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo
53	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo
56	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
58	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
59	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
63	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo
66	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
67	Positivo 1ºexame*	Negativo	Positivo	Positivo
68	Positivo 1ºexame*	Negativo	Positivo	Positivo
71	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo
74	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
76	Positivo 2ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
77	Positivo 1ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
78	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
80	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo
83	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Negativo
87	Positivo 1ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
88	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
89	Positivo 2ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
90	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Negativo
91	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Negativo
93	Positivo 2ºexame*	Negativo	Negativo	Negativo
100	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
106	Positivo 1ºexame*	Positivo	Positivo	Positivo
107	Positivo 1ºexame*	Positivo	Negativo	Positivo

BI = Borda interna da lesão

BE = Borda externa da lesão

\* amostras identificadas por isoenzimas como *L. braziliensis*

\*\* amostra identificada por isoenzimas como *L. amazonensis*

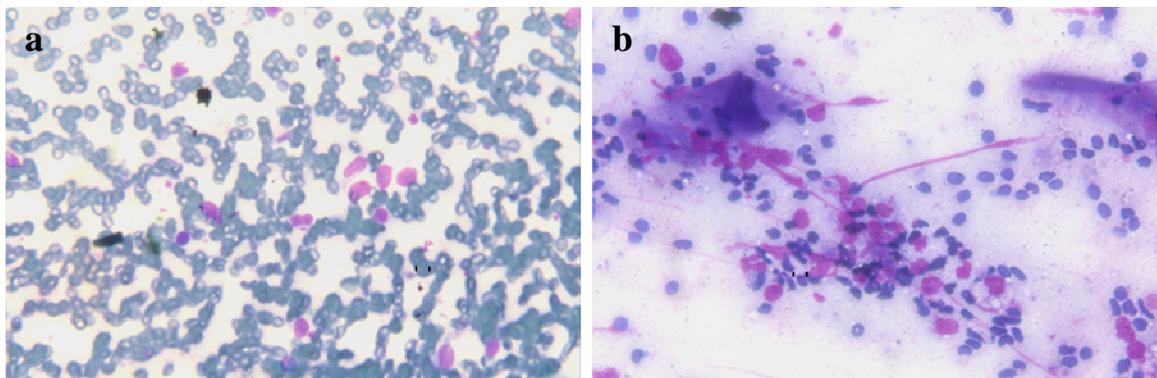
Com relação aos exames diretos, 28 pacientes foram positivos no “imprint”, demonstrando uma sensibilidade de 70%. As lâminas de escarificação em BE apresentaram resultados positivos em 17 pacientes, o que proporcionou uma sensibilidade de 42,5%. Já as lâminas de escarificação em BI foram positivas para 25 pacientes com sensibilidade de 62,5%. Quando a positividade dos três exames diretos foi combinada, o valor da sensibilidade alcançou 77,5%. Estes resultados podem ser observados na tabela 3.

Foi observada maior ocorrência de sangramentos quando a escarificação foi realizada em BE da lesão ( $p=0,04$ ).

A intensidade de dor indicada pelo paciente para o procedimento de escarificação realizado em borda interna foi maior do que em borda externa da lesão ( $p=0,029$ ).

Não foi encontrada significância estatística entre o tempo de evolução da lesão e a positividade nos exames diretos (“imprint” e escarificação) ( $p>0,05$ ).

As lâminas de escarificação BI de maneira geral apresentaram maior quantidade de células brancas e menos hemácias que as lâminas realizadas com material obtido de BE, o aspecto geral típico de ambas as preparações podem ser observado na figura 6.



**Figura 6** - Aspecto geral típico de uma lâmina de escarificação, após coloração pelo Giemsa realizada em borda externa (a) e interna (b) da lesão (400X).

A leitura de 1500 campos microscópicos foi suficiente para concluir 93% e 92% dos casos que apresentaram resultados positivos para o “imprint” e escarificação em BI, respectivamente. Esses resultados são apresentados na tabela 3.

Os demais parâmetros avaliados (concordância, kappa, valor preditivo positivo - VPP e negativo -VPN) são apresentados na tabela 4.

**Tabela 3** - Relação entre as áreas examinadas e a positividade para os exames diretos ("imprint", escarificação em BI e BE) em um grupo de pacientes com exame direto positivo ("imprint" ou escarificação) atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010).

Caselas* (n° de campos microscópicos)	Exames diretos					
	Imprint		Escarificação			
			BE		BI	
	n <sup>acum</sup>	%	n <sup>acum</sup>	%	n <sup>acum</sup>	%
1 (250)	12	42,9	9	52,9	14	56,0
2 (500)	16	57,1	12	70,6	15	60,0
3 (750)	19	67,9	12	70,6	17	68,0
4 (1000)	23	82,1	12	70,6	21	84,0
5 (1520)	24	85,7	13	76,5	23	92,0
6 (1500)	26	92,9	14	82,4	23	92,0
7 (1750)	26	92,9	14	82,4	24	96,0
8 (2000)	26	96,4	16	94,1	24	100,0
9 (2250)	27	96,4	16	94,1	25	100,0
10 (2500)	27	96,4	16	94,1	25	100,0
11 (2750)	27	96,4	16	94,1	25	100,0
12 (3000)	28	100,0	17	100,0	25	100,0

\*corresponde a área da lâmina, ilustrada na figura 1. Cada casela contém 250 campos microscópicos (x 1000)  
N<sup>acum</sup>: número de casos positivos acumulados em relação ao número de áreas demarcadas examinadas.

**Tabela 4** - Sensibilidade, concordância simples, Kappa, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) para as técnicas de "imprint" e escarificação em borda externa (BE) e borda interna (BI) da lesão em 110 pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC, FIOCRUZ, RJ (2009-2010).

Técnicas	Sensibilidade (%)	Concordância simples(%)	Kappa	VPP (%)	VPN (%)
"Imprint"	70,0 (61,4-78,5)	87,2 (84,0-90,4)	0,730 (Substancial)	100,0 (100-100)	81,8 (74,6-89,0)
Escarificação					
BE	42,5 (33,3-51,7)	75,5 (67,5-79,6)	0,461 (Moderado)	100,0 (100-100)	70,1 (61,5-78,6)
BI	62,5 (53,4-71,5)	84,0 (77,1-90,8)	0,659 (Substancial)	100,0 (100-100)	78,2 (70,4-85,9)

## 5. DISCUSSÃO

Neste estudo comparamos as sensibilidades das técnicas de “imprint” e escarificação realizada em dois locais da lesão (BE e BI) em relação ao padrão de referência (isolamento em cultura) para o diagnóstico da LTA em um grupo de 110 pacientes atendidos no laboratório de Vigilância em Leishmanioses no período de 2009-2010. O diagnóstico de leishmaniose tegumentar foi confirmado em 36,4% dos pacientes.

Esporotricose e piodermite foram, após a leishmaniose, os diagnósticos mais comuns, ressaltando-se a importância do diagnóstico diferencial entre estas doenças e a LTA, em especial a esporotricose, que no estado do Rio de Janeiro adquiriu há alguns anos proporções epidêmicas envolvendo pessoas e animais e se superpondo a áreas de incidência de LTA (BARROS et al., 2010). Os dados clínico-epidemiológicos observados no grupo de pacientes com diagnóstico de leishmanioses concordam com os padrões descritos para a doença no município do Rio de Janeiro: a) ocorrência em bairros, os quais já são conhecidos por serem áreas endêmicas para a LTA, com casos frequentemente descritos (KAWA & SABROZA, 2002, de OLIVEIRA-NETO et al., 2000). b) maior frequência de acometimento do sexo masculino e, c) ocorrência de lesões, com maior frequência nos membros superiores e inferiores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O tempo médio de evolução das lesões foi de 1-3 meses para 65% dos pacientes confirmados com leishmaniose (GL). O tempo de evolução das lesões de LTA tem sido associado à positividade dos exames parasitológicos (RAMIREZ et al., 2000). Neste estudo, apesar de termos encontrado maior positividade, nos exames diretos, em lesões recentes (1-3meses), quando tratado estatisticamente, tais resultados não demonstram associação significativa, discordando da literatura. É importante ressaltar que o tempo de evolução das lesões descrito no prontuário médico, foi dado pelo paciente, devendo-se considerar que muitas vezes o início dos sintomas pode passar despercebido pelo mesmo.

Para o diagnóstico das leishmanioses o isolamento em cultura, devido a sua elevada sensibilidade, capacidade de demonstração do parasita e possibilidade de armazenamento dos isolados para estudos futuros é tido como método padrão de referência, entretanto, possui como inconvenientes a possibilidade de contaminações, o custo e o tempo necessário para conclusão do exame (cerca de 30 dias). Em nosso estudo, em todos os casos diagnosticados pela cultura a observação do parasita ocorreu até o 14º dia de cultivo; essa característica vem sendo observada em nosso laboratório e corrobora resultados de outros estudos (LUZ et al., 2009). Tal resultado mostra que o isolamento em cultura, após duas semanas, constitui um evento raro para os parasitos do gênero *Leishmania*. A partir do isolamento em cultura foi possível identificar as amostras pela técnica de eletroforese de isoenzimas, técnica também considerada de referência para caracterização de *Leishmania*. Das 40 amostras isoladas, 39 foram identificadas como *L. braziliensis*, confirmando a incriminação dessa espécie como responsável pela maior parte dos casos de LTA no sudeste do país (LUZ et al., 2009). Uma única amostra apresentou perfil compatível com o de *Leishmania amazonensis*.

A amostra caracterizada como *L. amazonensis* foi isolada de um paciente que chegou ao serviço apresentando uma possível reativação clínica da doença, que havia sido adquirida e tratada pela primeira vez no estado do Maranhão. A reativação foi confirmada e a espécie identificada como *L. amazonensis*, que é endêmica no estado do Maranhão (SALDANHA et al., 1995; SALDANHA et al., 1992). Tal espécie causa na maioria dos casos, formas típicas de leishmaniose cutânea, entretanto, excepcionalmente pode causar um grave quadro de leishmaniose dependendo do indivíduo infectado, a forma cutânea difusa. No estado do Rio de Janeiro foi registrado apenas um caso autóctone desta doença e da infecção por *L. amazonensis* no ano de 2006 (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007). Esse resultado ressalta a importância da caracterização etiológica e monitoramento das espécies de *Leishmania* que são endêmicas nas diferentes regiões do país e que podem estar sofrendo migrações conforme o deslocamento humano.

Para o isolamento de *Leishmania* sp, utiliza-se meio de cultura extremamente rico em aminoácidos e proteínas, que favorece o crescimento de qualquer microrganismo infeccioso. O crescimento de fungos e bactérias é possível, uma vez que lesões cutâneas ulceradas são altamente suscetíveis a contaminação secundária (ZIAIE & SADEGHIAN, 2008). De outro lado, lesões cutâneas podem também ser causadas por diferentes agentes fúngicos, devendo-se ficar atento ao seu crescimento. Por essa

razão, quando observamos crescimento fúngico em amostras processadas para o diagnóstico da LTA, encaminhamos a cultura da amostra para o laboratório de Micologia Médica (IPEC/FIOCRUZ) para que este possa ser identificado. Dessa forma em 14 pacientes cujas amostras apresentaram crescimento de fungos, confirmou-se a presença de *Sporotrix shenckii* em nove pacientes. Essa alta taxa de isolamento de *S. shenckii* é favorecida, como já dito anteriormente, pela utilização de um meio de cultura rico em nutrientes como também pela baixa eficácia do antifúngico fluorocitosina, que é utilizado na solução salina usada para coleta da biópsia (ALVARADO-RAMIREZ & TORRES-RODRIGUEZ, 2007). Esse fluxo de amostras e parceria estabelecidos entre os laboratórios tem sido bastante útil para o diagnóstico final dos pacientes atendidos no IPEC-FIOCRUZ.

O exame direto constitui uma ferramenta de extrema utilidade para o diagnóstico da LTA, entretanto, o fato de ser uma técnica simples não dispensa a necessidade de pessoal qualificado para sua realização, já que o resultado final pode ser influenciado pela experiência do observador. A presença de determinadas estruturas nos exames diretos para LTA, pode constituir um fator de confusão e gerar erros no diagnóstico final, principalmente quando tais estruturas assemelham-se a formas amastigotas. Nessa situação, a visualização do cinetoplasto é decisiva para o diagnóstico de certeza, ressaltando, a importância da qualidade da coloração das preparações para o exame direto para LTA (MELLO et al, 2011). De outro lado, o relato pelo microscopista da presença dessas estruturas pode ser um alerta para o diagnóstico do paciente, uma vez que determinados agentes fúngicos podem ser confundidos com formas amastigotas. Estruturas leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* (SÃO THIAGO et al, 1998), de *Candida* sp e de *S. shenckii* (MELLO et al, 2011) tem sido relatadas como agentes que podem ser confundidos com formas amastigotas de *Leishmania* sp nos exames diretos. Apesar do encontro de leveduras de *S. shenckii* nos exames diretos ser um fato raro (MORRIS-JONES, 2002; PANG et al., 2004), em nosso estudo tais estruturas foram encontradas em um paciente HIV positivo (MELLO et al., 2011). Além disso, relatos de co-infecção por *Leishmania* sp. e *S. shenckii* (Agudelo, Restrepo et al. 1999) e infecções secundárias (bacterianas ou fúngicas) são também relativamente frequentes em lesões de LTA (ZIAIE & SADEGHIAN, 2008) o que pode inviabilizar o diagnóstico através da cultura. Nestas situações, o exame direto pode determinar o diagnóstico final de LTA.

Apesar de todas as vantagens, os exames citológicos diretos, apresentados neste estudo e também descritos na literatura, são tidos como métodos de baixa sensibilidade, já que estão diretamente relacionados à carga parasitária. No entanto, são métodos de grande aplicabilidade em vários aspectos e, nesse contexto, o procedimento de escarificação pode se apresentar como uma ferramenta poderosa, principalmente pela facilidade da implantação deste método nos níveis primários de assistência. Além de ser um método rápido, este método necessita de pequena infraestrutura, tem baixo custo e o material para exame é de fácil obtenção. Além disso, por ser pouco invasivo, pode permitir repetições do exame, sem a necessidade de recorrer a centros de referência especializados. Neste estudo, encontramos valores de sensibilidade de 70,0% para o “imprint” e de 42,5% e 62,5% para o procedimento de escarificação realizado em BE e BI, respectivamente. Estes resultados reforçam a importância dos métodos diretos para o diagnóstico de parte dos casos de LTA. Quando os três exames (“imprint, escarificação em BI e BE) foram associados, geraram uma sensibilidade de 77,5%, mostrando que a associação de diferentes métodos tende a aumentar a sensibilidade diagnóstica da LTA, como já revelado em outros estudos (RAMIREZ et al, 2000; FAGUNDES et al, 2010).

Os parâmetros de sensibilidade dos exames diretos para LTA podem ser extremamente variados, com índices de 32,7% (WEIGLE et al., 1987) a 90,4% (RAMIREZ et al, 2000). Sabe-se que tal variação pode estar relacionada a inúmeros fatores, entre eles o tempo de evolução da lesão, espécie de *Leishmania* responsável pelo caso, carga parasitária, sítio da lesão onde o parasita é pesquisado e, não podemos deixar de mencionar, a experiência do observador e o número de campos microscópicos e/ou lâminas examinadas (BRUSTOLONI et al., 2007). Na literatura científica, essas informações nem sempre são fornecidas, dificultando a comparação entre os resultados obtidos entre os vários estudos publicados. Ao compararmos o procedimento de escarificação realizado em dois locais da lesão, observamos índices de acurácia diferentes, demonstrando que o sítio para coleta na lesão é um aspecto que deve ser considerado, como já demonstrado previamente. RAMIREZ et al., 2000, observaram que no exame microscópico direto, os valores de sensibilidade saltaram de 78,3% para material obtido por biópsia realizada na borda da lesão para 90% por biópsias realizadas no centro da lesão. Adicionalmente, é também conhecido que os parasitas do gênero *Leishmania* distribuem-se de forma irregular nas lesões cutâneas (MENGISTU et al, 1992), característica que pode, também, influenciar os níveis de sensibilidade, de acordo

com o local da lesão em que é feita a coleta. Para o procedimento de escarificação, é sugerido que o raspado seja feito em mais de um local da lesão, visando dar mais chance de encontro do parasita, entretanto, em nosso estudo, optamos em realizar o procedimento de escarificação em um único local de BI e BE para que os resultados pudessem ser comparados com a cultura do fragmento de biópsia que foi retirado do mesmo local escarificado.

Embora o procedimento de escarificação para o diagnóstico da LTA não necessite de intervenção anestésica, não encontramos, na literatura, nenhuma referência à intensidade de dor gerada pelo procedimento. Tal aspecto, avaliado neste estudo, demonstrou que o procedimento realizado na borda interna da lesão foi mais doloroso do quando realizado na borda externa, ainda assim a realização cotidiana do procedimento revelou boa aceitabilidade da maioria dos pacientes e a facilidade de realização em indivíduos de diferentes idades e portadores de lesões localizadas em sítios que conferem maior sensibilidade.

Diferentemente da análise da dor que é voltada para o bem estar do paciente, o registro da ocorrência de sangramento é importante para a qualidade do material coletado para a análise. Apesar de ser aconselhável realizar a coleta com isquemia digital a fim de evitar sangramentos, neste estudo as coletas ocorreram sempre sem isquemia, por fatores ligados a localização das lesões, e a realização de procedimento por um único profissional. Os sangramentos foram mais frequentes quando a escarificação foi realizada na borda externa da lesão em relação ao procedimento realizado na borda interna. Isto ocorreu provavelmente porque no primeiro local foi necessário romper o tecido para coletar o material e esse procedimento acaba por atingir pequenos vasos sanguíneos gerando liberação de sangue. Dependendo da quantidade, a presença de hemácias pode atrapalhar a leitura das lâminas. No procedimento realizado na borda interna a coleta foi mais fácil fornecendo um material muito rico em células brancas e parasitos, com pouquíssimas hemácias, facilitando a leitura microscópica.

A escarificação em BI da lesão se mostrou superior em diferentes aspectos em relação a realizada em BE, como maior sensibilidade, menor ocorrência de sangramentos e melhor qualidade do material coletado, tendo em vista todos esses aspectos apontamos esse local como de eleição para realização do procedimento.

Outro fator já citado que influencia na sensibilidade do exame direto é o número de campos microscópicos lidos por lâmina para emissão dos resultados. Navin et al (1990), em seu estudo observou uma substancial elevação nos índices de positividade

que foi proporcional ao número de lâminas (campos microscópicos) examinadas. A OMS recomenda a leitura de 1000 campos microscópicos em objetiva de imersão antes que seja liberado um resultado negativo para amostras de baço em pacientes com suspeita de leishmaniose visceral (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1999), entretanto para leishmaniose cutânea não há qualquer referência na literatura sobre o número de campos a serem examinados, ficando o profissional forçado a examinar toda a lâmina. Por esse motivo, neste estudo, estabelecemos critérios de confecção da lâmina e das leituras das mesmas, visando uma uniformização dos métodos, a fim de avaliar se existe um número ideal de campos microscópicos a serem lidos, antes da liberação de resultados negativos

Os critérios utilizados, tanto para confecção das lâminas, assim como para as leituras, nos indicaram que o exame de cerca de 1500 campos microscópicos foi suficiente para concluir 93% e 92% dos casos que apresentaram resultados positivos para o “imprint” e escarificação em BI, respectivamente. Exames diretos costumam despende certo tempo e esse dado torna-se relevante se consideramos a demanda de laboratórios que realizam esse exame na rotina diagnóstica. Otimizando o tempo gasto com a leitura das lâminas e diminuindo o desgaste do profissional responsável pelo diagnóstico, já que é recomendado que a visualização das formas amastigotas, nos exames diretos, seja realizada por no mínimo duas pessoas antes da liberação do resultado final, pode-se melhorar a qualidade do resultado.

Já que o diagnóstico precoce constitui uma das medidas mais eficazes no controle da doença, a adoção de métodos eficientes e de baixo-custo torna-se essencial, principalmente em níveis primários da assistência (SZARGIKI et al., 2009). Os parâmetros de acurácia apresentados neste estudo apontam que os métodos diretos podem ser empregados com segurança no diagnóstico da LTA, em especial, o procedimento de escarificação em BI, devido a facilidade de confecção e ao baixo custo do exame, além de permitir repetições do procedimento em diferentes momentos, aumentando a chance de encontro do parasito, contribuindo para o diagnóstico dos casos de LTA.

## 6. CONCLUSÕES

- 1) Os valores de sensibilidade obtidos, aliados à facilidade de execução e aplicabilidade das técnicas de “imprint” e escarificação em borda interna de lesão mostram que essas metodologias podem ser empregadas com segurança e utilizadas para o diagnóstico de parte dos casos da LTA;
- 2) O procedimento de escarificação foi de fácil execução, independente do local, entretanto, a qualidade do material coletado na borda interna foi superior à coleta em borda externa;
- 3) A comparação da sensibilidade diagnóstica para o procedimento de escarificação realizado em dois locais da lesão aponta a borda interna como local de eleição para a realização do procedimento;
- 4) A ocorrência de sangramentos foi menor quando a escarificação foi realizada em BI da lesão, entretanto esse local foi indicado como mais doloroso pelos pacientes;
- 5) *Leishmania braziliensis* foi a espécie de maior prevalência no grupo estudado, corroborando dados da literatura que apontam essa espécie como principal responsável pelos casos de LTA no estado do Rio de Janeiro;
- 6) O encontro de um isolado de *Leishmania amazonensis* ressalta a importância da vigilância epidemiológica no monitoramento das espécies circulantes no Brasil;
- 7) A visualização de estruturas semelhantes a amastigotas em pacientes com outros diagnósticos indica que, mesmo nesta metodologia, o treinamento e experiência a equipe seja fundamental para o correto diagnóstico da infecção;
- 8) Os critérios para confecção e para leitura dos exames diretos permitiram estabelecer um número de campos mínimos para emissão dos resultados e demonstrou que o método de escarificação deve ter esses critérios padronizados e uniformizados, garantindo qualidade do diagnóstico que é realizado em diferentes regiões do Brasil;

- 9) Nossos resultados permitem propor a implantação do exame padronizado como técnica de rotina diagnóstica, principalmente nos locais onde o acesso a métodos mais complexos é limitado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. *Acta trop* 2006; 99(1):55-61.

Al-Jitawi SA, Farraj SE, Ramahi SA. Conventional scraping versus fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Cytol* 1995;39(1):82-4.

Alvarado-Ramírez E, Torres-Rodríguez JM. In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(7):2420-3.

Andresen K, Gaafar A, El-Hassan AM, Ismail A, Dafalla M, Theander TG, Kharazmi A. Evaluation of the polymerase chain reaction in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*: a comparison with direct microscopy of smears and sections from lesions. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996;90(2):133-5.

Azeredo-Coutinho RB, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007(7):735-7.

Bahamdan KA, Khan AR, Tallab TM, Mourad MM. Value of touch preparations (imprints) for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 1996;35(8):558-60.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 2009;121(4):317-22.

Barros MB, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Rev Panam Salud Publica* 2010;27(6):455-60.

Barroso-Freitas AP, Passos SR, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GP, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009;103(4):383-9.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1435-9.

Bouvier J, Etges RJ, Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J Biol Chem* 1985;260(29):15504-9.

Brito MMC, Tarquínio DC, Arruda D, Costa RS, Roselino AM. Tzanck smears: an old but useful diagnostic tool. *An Bras Dermatol* 2009; 84(4):431-3

Brustoloni YM, Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, Pontes ER, Oliveira AL et al. Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of the Center-West Region of Brazil. *Braz J Infect Dis* 2007;11(1):106-9.

Cataldo JI, de Queiroz Mello FC, Mouta-Confort E, de Fátima Madeira M, de Oliveira Schubach A, da Silva Genestra M, et al. Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Clin Lab Anal* 2010;24(5):289-94.

Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1995;53(3):273-77.

Castillo CM, Rojas C. Evaluation of popular stains for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997;92 (4):531-2.

CFDIS Association of America [homepage na internet]. Assessing and Documenting Impairment in CFS [Acesso em 20 dez 2010]. Disponível em: <http://www.cfids.org/ok/impairment.pdf>

Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50(3):296-311.

Da-Cruz A, Pirmez C, Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2005. p.597-708.

Da-Cruz AM, Machado ES, Menezes JA, Rutowitsch MS, Coutinho SG. Cellular and humoral immune responses of a patient with American cutaneous leishmaniasis and AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1992;86(5):511-2.

de Andrade HM, Reis AB, dos Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 2006 10;140(3-4):231-8.

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; 93(1):41-7.

de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahin LR, Menezes CR, Pirmez C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 2000;39(7):506-14.

Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001 ;95(3):239-43.

Durdu M, Baba M, Seçkin D. More experiences with the Tzanck smear test: cytologic findings in cutaneous granulomatous disorders. *J Am Acad Dermatol* 2009;61(3):441-50.

Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Knecht-Junk KJ, Hofwegen H, van der Wal AC, Kager PA. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(1):70-4.

Fagundes A, Antônio L, Schubach A, Marzochi KBF. Comparison between in vivo measurement of the Montenegro skin test and paper recording. *Int J Dermatol* 2010 (In Press).

Fagundes A, Marzochi KB, Marzochi MC. Immediate and generalized reaction to Montenegro skin test. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(3):413-4.

Gontijo B, Carvalho ML. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003;36 (1):71-80.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8(4):419-33.

Griffiths WA, Dutz W. Repeated tissue sampling with a dental broach. A trial in cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol* 1975;93(1):43-5.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol* 1998;36(7):1989-95.

Hendricks L, Wright N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's *Drosophila* Medium. *Am J Trop Med Hyg* 1979;28(6):962-4.

Hockmeyer WT, Kager PA, Rees PH, Hendricks LD. The culture of *Leishmania donovani* in Schneider's insect medium: its value in the diagnosis and management of patients with visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1981;75(6):861-3.

Ihalmulla RL, Rajapaksa US, Karunaweera ND. Microculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions -- Sri Lankan experience. *Ann Trop Med Parasitol* 2005;99(6):571-5.

Jensen AT, Gaafar A, Ismail A, Christensen CB, Kemp M, Hassan AM, Kharazmi A, Theander TG. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. *Am J Trop Med Hyg* 1996;55(5):490-5.

Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21(2):123-52.

Kassi M, Tareen I, Qazi A, Kasi PM. Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Ann Saudi Med* 2004;24(2):93-7.

Landis JR, Koch GG. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 1977;33(2):363-74.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution: The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: Academic press;1987.

Lightner KL, Chulay JD, Bryceson ADM. Comparison of microscopy and culture in the detection of *Leishmania donovani* from splenic aspirates. *Am J Trop Med Hyg* 1983; 32(2):296-9.

Luz ZM, Silva AR, Silva FO, Caligiorne RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009; 104 (1):62-6.

Markle WH, Makhoul K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician* 2004; 69(6):1455-60.

Marsden PD, Tada MS, Barreto AC, Cuba CC. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis* skin ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1984;78(4):561-2.

Marzochi MC, Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 1994;10(2):359-75.

Mello CX, Schubach AO, Madeira MF. Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis? *Rev Soc Bras Med Trop* 2011 (In press).

Mello CX, Madeira MF, Abrantes S. Avaliação do efeito dos antimicrobianos benzilpenicilina, estreptomicina e flucitosina no crescimento "in vitro" de *Leishmania braziliensis*. *Analytica* 2010; 49:72-8.

Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004;189(6):1018-23.

Mengistu G, Akuffo H, Fehninger TE, Negese Y, Nilsen R. Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:154-7.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.

Montoya Y, Leon C, Talledo M, Nolasco O, Padilla C, Muñoz-Najar U, et al.. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997;91(6):674-6.

Montenegro J. Acute reaction in leishmaniasis. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo*. 1926;1:323-30.

Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol*. 2002; 27:427-31.

Mouta-Confort E. Ensaio imunoenzimático com antígeno de *leishmania (viannia) braziliensis* no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz; 2009.

Naiff RD. A Scarifier for Obtaining Specimens for Diagnosis of Leishmaniasis and Other Skin Infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92 (1): 87.

Navin TR, Arana FE, de Mérida AM, Arana BA, Castillo AL, Silvers DN. Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42(1):36-42.

Novy FG, McNeal WJ. On the cultivations of trypanosome brucei. *J Infect Dis* 1904; 1 (1):1-30.

Oliveira-Neto MP, Achubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. A low dose antimony treatment in 159 pacientes with American Cutaneous Leishmaniasis: extensive follow-up studies(up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 1997;57(6):651-5.

Organização Mundial de Saúde [HOMEPAGE NA INTERNET]. Leishmaniasis. [ACESSO EM 14 JAN 2011]. DISPONÍVEL EM: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>

Organização Mundial de Saúde. Procedimentos laboratoriais em parasitologia médica. 2ªed. Geneva: WHO. 1999

Palomino JC, Guerra H, Lumbreras H. A selective liquid medium for primary isolation of South American Leishmanias. *Tropenmed Parasitol* 1983;34(4):229-32.

Pang KR, Wu JJ, Huang DB, Yring SK. Subcutaneous fungal infections. *Dermatol Ther* 2004; 17:523-31.

Ramírez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Velez ID. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol* 2000;38(10):3768-73.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007;7(9):581-96.

Rey-Ladino JA, Joshi PB, Singh B, Gupta R, Reiner NE. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp Parasitol* 1997;85(3):249-63.

Robinson RJ, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker DC, Vélez ID. The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96 Suppl 1:S169-71.

Rodríguez N, Guzman B, Rodas A, Takiff H, Bloom BR, Convit J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994;32(9):2246-52.

Rogers L. Preliminary note on the development of trypanosome in cultures of the Cunningham-Leishman-Donovan bodies of cathexial fever and kalazar. *Lancet* 1904; (ii):215-6.

Romero GA, Sampaio RN, Macedo Vde O, Marsden PD. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(4):505-8.

Ross R, Further notes on Leishman bodies. *Brit Med J* 1904;28:1401.

Ruocco E, Brunetti G, Del Vecchio M, Ruocco V. The practical use of cytology for diagnosis in dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010.

São Thiago, PT, Santos JI, Steindel M. Histoplasmose em região de palato duro simulando lesão causada por *Leishmania*. *Rev Soc Bras Med Trop* 31(2):225-9,1998.

Saldanha AC, Malheiros TS, Rodrigues C da C, Balby IT, Costa JM. Bone alterations observed in diffuse cutaneous leishmaniasis in the State of Maranhão. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995;28(1):55-6.

Saldanha AC, Silva AC, Galvão CE, Silva CM, Costa JM. The origin of patients who are carriers of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1992;25(4):271-3.

Schneider WH. Pioneers and pathfinders: Arnault Tzanck, MD (1886-1954). *Transfus Med Rev* 2010; 24 (2):147-50.

Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96(7): 987-96.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi Jr G et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 1998;178(3):1-4.

Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, Mohebbali M, Abadi AR, Zare Z. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. *Parasitol Res* 2008;103(5):1159-62.

Silva OD. Sobre a leishmaniose tegumentar e seu tratamento. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1915; 7(2):213-48.

Silveira TG, Arraes SM, Bertolini DA, Teodoro U, Lonardon MV, Roberto AC, Ramos M, Nerilo Sobrinho A, Ishikawa E, Shaw J. The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Paraná State, southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(4):413-23.

Silveira FT, Laison R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of american cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(11):1075-80.

Sokal J E. Editorial: Measurement of delayed skin-test responses. *N Engl J Med* 1975; 293(10):501-502.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerron J, et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 2008;118(4):1301-10.

Steindel M, Grizard EC. *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Leishmania* spp. In: *Parasitologia Clínica: Seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001.435-45.

Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Parana, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2009;13(1): 47-52.

Ul Bari A, Ber Rahman S. Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2006;72(1):28-32.

Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(2):97-101.

Vergel C, Palacios R, Cadena H, Posso CJ, Valderrama L, Perez M, Walker J, Travi BL, Saravia NG. Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. *J Infect Dis* 2006 15;194(4):503-11.

Weigle KA, de Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 1987;36(3):489-96.

Wortmann G, Hochberg L, Houg HH, Sweeney C, Zapor M, Aronson N, et al. Rapid identification of *Leishmania* complexes by a real-time PCR assay. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73(6):999-1004.

Ziaie H, Sadeghian G. Isolation of bacteria causing secondary bacterial infection in the lesions of Cutaneous Leishmaniasis. *Indian J Dermatol* 2008;53(3):129-31.

## **ANEXOS**

ANEXO 1 – TERMO DE OUTORGA RELACIONADO AO AUXILIO  
CONCEDIDO PELA FAPERJ AO PROJETO “COMPARAÇÃO DOS  
PROCEDIMENTOS DE "IMPRINT" E ESCARIFICAÇÃO NO  
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA”  
- PROGRAMA APQ1/PROCESSO E26/ 110.892/2009

**FAPERJ**

GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
 Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia  
 FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

**FAPERJ**

Processo Nº E-26 \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
 Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Fls. \_\_\_\_  
 Rubrica: \_\_\_\_\_

**TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO**

Rio de Janeiro, 05 / 10 / 2009

**Nº DO PROCESSO** E-26/ 110.892/2009 **Nº DE MATRÍCULA** 2007.1833.5  
**PROGRAMA** APQ1 2009/1 **Parcela:** Única

**PROJETO** Comparação dos procedimentos de imprint e escarificação no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

**OUTORGANTE** Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

**OUTORGADO** Maria de Fátima Madeira

**ENDEREÇO** Rua Abélia, 225/202  
 Ilha do Governador  
 RJ 21940-010 **TEL.** Rio de Janeiro 3865-9541

**E-MAIL** fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br

**INSTITUIÇÃO** FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz  
**UNIDADE** Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas  
**DEPARTAMENTO** Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

**PLANO DE APLICAÇÃO**

<b>CUSTEIO</b>	15.100,00	
Mat. Consumo Nacionais		14.550,00
Serv. Terc. Pessoa Física		550,00
<b>CAPITAL</b>	4.900,00	
EQ. e Mat. Perm. Nacionais		4.900,00
<b>TOTAL</b>		20.000,00

**REPRESENTANTE DA INSTITUIÇÃO** : Diretor do Departamento**RELATÓRIO(S) CIENTÍFICO(S)** a serem apresentados no prazo de 12 (doze) meses após a data do último pagamento do Auxílio.**PRESTAÇÃO DE CONTAS** a ser apresentada no prazo de 12 (doze) meses após a data do último pagamento do Auxílio.  
(com devolução de saldo, se houver) - VIDE CLÁUSULAS VI e VII

Declaro que os dados acima foram conferidos por mim nesta data, estando os mesmos corretos.

Rio, 05 de outubro de 2009.

Luís de Sá - Lu  
 assinatura

ANEXO 2 – DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS PARCIAIS DESTA  
DISSERTAÇÃO – XLVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA  
DE MEDICINA TROPICAL 2010, FOZ DO IGUAÇU-PR, BRASIL.

1. MELLO CX, SCHUBACH AO, PIMENTEL MIF, LYRA MR, VASCONCELLOS ECF, MADEIRA MF. Diagnóstico parasitológico direto da leishmaniose tegumentar americana (LTA). artefatos e outros parasitas podem dificultar o exame? [Apresentação no XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2010 mar14-11; Paraná, Brasil].
2. MELLO CX, SCHUBACH AO, OLIVEIRA RVC, CONCEIÇÃO-SILVA F, PIMENTEL MIF, LYRA MR, VASCONCELLOS ECF, MADEIRA MF. Avaliação comparativa da sensibilidade do "imprint" e escarificação no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em pacientes atendidos no laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz [Apresentação no XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2010 mar14-11; Paraná, Brasil].



### DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DIRETO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA): ARTEFATOS E OUTROS PARASITAS PODEM DIFICULTAR O EXAME?

#### Autores:

Cintia X Mello, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
 Armando O Schubach, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
 Maria If Pimentel, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
 Marcelo R Lyra, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
 Érica Cf Vasconcellos, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
 Maria De F Madeira, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL

#### Palavras Chave:

Leishmaniose cutânea, diagnóstico, exame direto

#### Resumo:

**Introdução:** As técnicas de imprint e escarificação são sem dúvida, as mais utilizadas para o diagnóstico da LTA, principalmente pelo baixo custo e facilidade de implantação do método.

**Objetivo:** Relatar características do exame citológico direto no diagnóstico da LTA, onde o encontro de estruturas fúngicas poderia gerar interpretações confusas no diagnóstico final.

**Material e Métodos:** Três pacientes, portadores de lesões cutâneas, foram atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses(IPEC/FIOCRUZ).

Realizaram-se os procedimentos de escarificação e coletaram-se fragmentos de biopsia para imprint, cultura (leishmania, bactérias e fungos) e histopatologia.

As lâminas foram fixadas em metanol, coradas pelo Giemsa e examinadas por microscopia óptica (MO-1000X).

**Resultados:**Caso 1: O exame citológico por MO revelou a presença de inúmeras estruturas elipsóides e arredondadas com presença de núcleo, localizadas no interior e exterior de macrófagos.

Tais estruturas embora com grande semelhança a formas amastigotas, não apresentavam cinetoplasto.

O diagnóstico final de esporotricose foi dado pela cultura para fungos.

Caso 2: Observaram-se estruturas seguramente compatíveis com formas amastigotas, e elementos fúngicos dispersos no material com grande semelhança estrutural ao citado no caso 1, porém com halo transparente ao redor.

A cultura para Leishmania sp apresentou crescimento bacteriano e o cultivo para fungos revelou crescimento de Candida sp.

O diagnóstico final de LTA foi dado pelo exame direto.

Caso 3: Elementos fúngicos com presença de halo transparente foram observados.

A cultura para Leishmania sp apresentou crescimento fúngico e o cultivo micológico foi negativo.

O diagnóstico final foi dado pela histopatologia, que revelou características compatíveis com úlcera de estase, no tecido.

**Conclusão:** A realização de exames diretos necessita de pessoal treinado e leituras cuidadosas, observando determinadas características morfológicas, as quais podem ser importantes para a conclusão do caso.

É fundamental que tais resultados sejam combinados com a história clínica, epidemiológica e quando possível com outros exames laboratoriais



**AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA SENSIBILIDADE DO IMPRINT E  
ESCARIFICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA (LTA) EM PACIENTES ATENDIDOS NO LABORATORIO DE  
VIGILANCIA EM LEISHMANIOSES DO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA  
EVANDRO CHAGAS, FIOCRUZ.**

**Autores:**

Cintia X Mello, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC,  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
Armando O Schubach, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC,  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
Raquel Vc Oliveira, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC,  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
Fátima Conceição-silva, INSTITUTO OSWALDO CRUZ – IOC, FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ-  
FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
Maria If Pimentel, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC,  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
Marcelo R Lyra, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC,  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
Érica Cf Vasconcellos, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC,  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL  
Maria De F Madeira, VIGILEISH - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – IPEC,  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ- FIOCRUZ, RIO DE JANEIRO, BRASIL

**Palavras Chave:**

Leishmaniose cutânea, diagnóstico, escarificação

**Resumo:**

**Introdução:** Na LTA a demonstração do parasito é importante para o diagnóstico de certeza, já que a infecção apresenta uma variedade de manifestações clínicas que podem ser confundidas com outras doenças.

Os métodos parasitológicos diretos são de grande utilidade nesse contexto.

**Objetivos:** Comparar a sensibilidade dos procedimentos de imprint e escarificação frente à cultura e avaliar dois locais da lesão (borda interna e externa) para escarificação, considerando aspectos como dor, sangramentos e encontro do parasita.

**Material e métodos:** Foram avaliados pacientes com suspeita clínica de LTA atendidos no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses-IPEC/FIOCRUZ.

Após exame clínico, foi realizado o procedimento de escarificação, inicialmente na borda externa e em seguida na borda interna, cujo nível de dor foi avaliado apresentando ao paciente uma escala de 0 a 10.

Posteriormente, considerando o local escarificado, foi realizada biópsia para realização do imprint e cultura.

As lâminas para o exame direto foram fixadas em metanol e coradas pelo Giemsa.

**Resultados:** Trinta pacientes foram avaliados, dos quais 12 foram positivos na cultura, identificados como L.

braziliensis e 6 tiveram a cultura contaminada por fungos, sendo três diagnosticados como esporotricose.

Pelo imprint, 9(75%) pacientes foram positivos e na escarificação, 7(58%) foram positivos ao exame de borda externa e 8(66%) em borda interna, todos, positivos à cultura.

Quanto ao nível de dor ao procedimento de escarificação realizado na borda externa, 16 pacientes relataram níveis variando de 1 a 7 (média=1,5), já na borda interna, 20 pacientes identificaram níveis mais elevados, variando de 1 a 10 (média=2,9).

Em ambas as bordas não houve diferença no nível de sangramento.

Conclusões: Os resultados demonstram que os exames diretos são capazes de resolver parte dos casos de LTA e que a coleta do procedimento de escarificação deve ser uniformizado para que possa ser empregado, principalmente em locais com poucos recursos laboratoriais.

ANEXO 3 – DIVULGAÇÃO DE RESULTADOS PARCIAIS DESTA  
DISSERTAÇÃO – XLVII CONGRESSO DA SOCIEDADE  
BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL 2011, NATAL - RN,  
BRASIL.

3. MELLO CX, SCHUBACH AO, OLIVEIRA RVC, CONCEIÇÃO-SILVA F, PIMENTEL MIF, LYRA MR, VASCONCELLOS ECF, MADEIRA MF. Comparação da sensibilidade do "imprint" e da escarificação no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em um centro de referência no Rio de Janeiro, Brasil [Apresentação no XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; 2011 mar 23-26; Rio Grande do Norte, Brasil].

## ÁREA TEMÁTICA: DOENÇAS POR PROTOZOÁRIOS

P-0623

TÍTULO: COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO "IMPRINT" E DA ESCARIFICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA NO RIO DE JANEIRO, BRASIL

AUTOR (ES): CINTIA XAVIER DE MELLO, ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH, RAQUEL DE VASCONCELLOS CARVALHAES DE OLIVEIRA, FÁTIMA CONCEIÇÃO-SILVA, MARIA INÊS FERNANDES PIMENTEL, MARCELO ROSANDISK LYRA, ÉRICA CAMARGO FERREIRA E VASCONCELOS, MARIA DE FÁTIMA MADEIRA,

INSTITUIÇÃO: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Introdução:** No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença em expansão, cujo diagnóstico de certeza implica na demonstração do parasito. A implantação dos métodos diretos é uma necessidade em muitas regiões do País, principalmente por constituírem métodos de execução simples e de baixo custo operacional e por permitirem repetições do procedimento, em diferentes momentos, aumentando a chance de encontro do parasito. Os objetivos deste estudo foram comparar a sensibilidade do exame direto realizado através do *imprint* e da escarificação realizada em borda externa (BE) e da borda interna (BI) da lesão cutânea. **Material e métodos:** Os pacientes foram atendidos no ambulatório do IPEC/FIOCRUZ/Rio de Janeiro (2009-2010). A escarificação foi realizada em BI e BE da lesão cutânea, com registro de ocorrência de sangramento e relato de dor através de escala analógica visual. A biópsia foi realizada no mesmo local das escarificações e fracionada para preparação do *imprint* e cultura. O isolamento de *Leishmania* em cultura com posterior caracterização por isoenzimas foi utilizado como padrão de referência para o cálculo da sensibilidade do exame direto. Os exames diretos foram confeccionados, de forma seqüencial, em lâminas de vidro com áreas demarcadas e com número de campos conhecidos. **Resultados:** Dos 110 pacientes incluídos no estudo, 40 foram diagnosticados com leishmaniose cutânea por isolamento em cultura, sendo 39 causados por *Leishmania braziliensis* e 1 por *L. amazonensis*. Os exames diretos apresentaram sensibilidade de 70,0%, 62,5 e de 42,5% para o *imprint*, escarificação em BI e BE, respectivamente. A BI da lesão apresentou maior desconforto para a coleta do material, menor ocorrência de sangramentos e maior sensibilidade para o encontro de formas amastigotas (**P**-valores<0,05), quando comparada com BE. Foi necessário o exame de cerca de 1500 campos microscópicos para concluir 93% e 92% dos casos positivos para o *imprint* e escarificação BI, respectivamente. **Discussão:** Os resultados encontrados demonstram que a mudança do sítio de coleta de material exerce influência no encontro de formas amastigotas, sendo importante considerar este aspecto. Apesar de ter sido apontado como mais doloroso, a escarificação em BI apresentou menor ocorrência de sangramento, melhor qualidade do material, além de maior sensibilidade apontando esse local como de eleição para o procedimento de escarificação. Adicionalmente, nossos resultados sugerem que a leitura de 1500 campos microscópicos seja suficiente para conclusão da maioria dos casos. **Conclusão:** Além de apresentarem relativa sensibilidade, os métodos diretos, em especial, o procedimento de escarificação em BI, podem ser empregados com segurança no diagnóstico da forma cutânea da LTA.

ANEXO 4 – PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS  
PARCIAIS DESTA DISSERTAÇÃO

---

Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis  
of American cutaneous leishmaniasis?

Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

---

Este artigo relata o encontro de estruturas fungicas, que poderiam gerar confusão com formas amastigotas, que foram visualizadas durante a leitura das lâminas de “imprint” e escarificação de um paciente com suspeita clínica de LTA. Esse encontro ressalta a importância do treinamento e qualificação de pessoal para realização do exame direto para o diagnóstico da LTA.



## Images in Infectious Diseases/Imagens em DIP

### Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis?

Estruturas leveduriformes de *Sporothrix schenckii* podem gerar confusão no diagnóstico parasitológico direto da leishmaniose tegumentar americana?

Cintia Xavier de Mello<sup>1</sup>, Armando de Oliveira Schubach<sup>1</sup> and Maria de Fátima Madeira<sup>1</sup>



A

B

A 44 year-old HIV-positive male patient with ulcerated lesions in the palate, third left toe and right thigh (Figure A) was treated at the Leishmaniasis Clinic of the Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation (IPEC/FIOCRUZ) for diagnostic investigation. A biopsy of the thigh and palate lesion was performed for culture isolation of *Leishmania*, fungi and mycobacteria, while for direct examination, scarification and imprint slides were prepared with material from the thigh lesion. Following fixation by methanol and Giemsa staining, scarification and imprint slides of the thigh lesion were examined under a light microscope with an immersion objective (x 1.000). Analysis revealed the presence of numerous rounded and ellipsoid structures located inside and outside macrophages (Figure B). Although these structures are similar to amastigotes in size and shape, they presented no kinetoplast, which is a key feature for *Leishmania* parasite confirmation. The mycological culture of fragments of the palate and thigh lesion was positive for *Sporothrix schenckii*.

In the State of Rio de Janeiro, both sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis (ATL) occur in overlapping areas. This affects different animal species, including man, and is a confounding factor in the diagnosis (clinical and laboratory) of both diseases. In the present study, probably due to the HIV infection, numerous structures of yeast-like form of *S. schenckii* were observed. The presence of such structures in the direct examination is a rare event; however, they indicate the need for skilled professionals and thorough analyses of direct examinations, taking into account the morphological features specific to the parasite, in order to adequately diagnose the case.

#### REFERENCES

1. Leishmaniasis Surveillance Laboratory, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Address to: Dra. Cintia Xavier de Mello. Laboratório em Vigilância em Leishmanioses/IPEC/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ.

Telefax: 55 21 3865-9541

e-mail: cintia.mello@ipec.fiocruz.br

Received in 23/07/2010

Accepted in 06/10/2010

1. Barros MBL, Schubach TMP, Galhardo MCG, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, et al. Sporotrichosis: an Emergent Zoonosis in Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96:777-779.
2. Neto RJP, Machado AA, Castro G, Quaglio ASS, Martinez R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome de imunodeficiência adquirida - relato de caso. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32:57-61.
3. Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. Curr Opin Infect Dis 2008; 21:129-133.

## ANEXO 5 – PUBLICAÇÃO RELACIONADA AOS RESULTADOS DESTA DISSERTAÇÃO

---

Comparação da sensibilidade do "imprint" e da escarificação no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em um centro de referência no Rio de Janeiro, Brasil. Artigo submetido à revista Parasitology Research

---

O diagnóstico parasitológico da LTA pode ser realizado através da pesquisa direta do parasito utilizando os procedimentos de "imprint" e escarificação, sendo este último o método mais rápido, de menor custo e de fácil execução. Por conta disso o Ministério da Saúde tem incentivado a implantação do procedimento de escarificação em todos os LACENS, sendo importantes tanto o conhecimento dos parâmetros de acurácia deste método quanto a padronização relacionada a forma de coleta e leitura, para que possa ser aplicado de forma padronizada em todo o Brasil.

### **Objetivos:**

Este artigo avalia a sensibilidade dos métodos diretos (escarificação em borda interna e externa da lesão e "imprint") tendo como padrão de referência o isolamento em cultura, além disso, visa estabelecer critérios de coleta e leitura para o procedimento de escarificação, com fins de uniformização do método para propor sua aplicação em diferentes regiões brasileiras.

### **Principais resultados:**

Dentre os 110 pacientes analisados 40 foram confirmados com leishmaniose. O "imprint" foi positivo em 28 pacientes conferindo-lhes sensibilidade de 70%, a escarificação realizada em borda externa foi positiva em 17 pacientes e em borda interna em 25 alcançando sensibilidade de 42,5% e 62,5% respectivamente. Além de mais sensível o material obtido da borda interna da lesão apresentou uma maior quantidade de células brancas e menos hemácias facilitando a leitura da lâmina. Os parâmetros de acurácia foram satisfatórios demonstrando que esses métodos podem ser empregados com segurança em locais onde não existe acesso a metodologias mais complexas.



**Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis in a Referral Centre in Rio de Janeiro, Brazil**

Journal:	<i>Parasitology Research</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Mello, Cintia; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses Schubach, Armando; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses Oliveira, Raquel; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Laboratório de Epidemiologia Clínica Conceição-Silva, Fátima; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Imunoparasitologia Pimentel, Maria; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses Lyra, Marcelo; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses Vascellos, Érica; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses Madeira, Fatima; Fundação Oswaldo Cruz - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses
Keywords:	American Tegumentary Leishmaniasis, sensitivity, direct examination, scraping, imprint

1  
2  
3 Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American  
4 Tegumentary Leishmaniasis in a Referral Centre in Rio de Janeiro, Brazil  
5  
6  
7

8  
9 Cintia Xavier de Mello • Armando de Oliveira Schubach • Raquel Vasconcellos Carvalho de  
10 Oliveira • Fátima Conceição-Silva • Maria Inês Fernandes Pimentel • Marcelo Rosandiski Lyra •  
11 Érica Camargo Ferreira e Vasconcellos • Maria de Fátima Madeira  
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 C. X. Mello (✉) • A. O. Schubach • R. V. C. Oliveira • M. I. F. Pimentel • M. R. Lyra • E. C. F.  
44 Vasconcelos • M. F. Madeira  
45 Laboratório de Vigilância em Leishmanioses  
46 Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC  
47 Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ  
48 Avenida Brasil, 4365  
49 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
50 Email: [cintia.mello@ipecc.fiocruz.br](mailto:cintia.mello@ipecc.fiocruz.br)  
51 Tel/Fax: 3865-9541  
52

53 R.V.C. Oliveira  
54 Laboratório de Epidemiologia Clínica  
55 Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - IPEC  
56 Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ  
57

58 F. Conceição-Silva  
59 Laboratório de Imunoparasitologia  
60 Instituto Oswaldo Cruz - IOC  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

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

**Abstract** American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious disease that presents a wide spectrum of clinical manifestations, parasitological tests being important for its diagnosis. Direct examination, although considered of low sensitivity is still employed mainly in areas with poor laboratory infrastructure. In this study, we sought to standardize the collection method and readings of the scraping procedure and to compare its sensitivity, conducting it at two sites of the lesion (outer edge-OE and inner edge-IE) and of imprint against the reference method (isolation in culture) in a group of 110 patients treated at a Referral Center in Rio de Janeiro, Brazil. ATL diagnosis was confirmed in 40 patients (36.4%), 39 cases were caused by *L. braziliensis* and 1 by *L. amazonensis*. Imprint was positive in 28 patients and scraping in OE in 17 and in IE in 25 patients, resulting in sensitivity of 70%, 42.5% and 62.5% respectively. When the three direct examinations were combined, sensitivity value reached 77.5%. This study also raised and discussed aspects related to the ease and quality of the collected material, pain intensity and frequency of bleeding of the scraping procedure. The accuracy parameters presented indicate that the direct methods can be used safely in ATL diagnosis, mainly scraping in IE, due to the ease of conduction and low cost of the examination, besides allowing repetitions of the procedure in different times, increasing the chance of finding the parasite, thus contributing to resolve ATL cases.

**Key-words:** American Tegumentary Leishmaniasis, sensitivity, direct examination, scraping, imprint.

### Introduction

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious disease which occurs in countries localized in tropical and subtropical areas (Brazil 2007). The parasite, *Leishmania* sp., is transmitted through the bite of a sandfly with inoculation of promastigote forms which differentiate to amastigotes in the tissue of the vertebrate host, causing a wide spectrum of clinical manifestations.

The diagnosis of ATL is not always an easy task, and should, wherever possible be supported in clinical aspects, epidemiologic evidence in combination with laboratory tests, considering also the differential diagnosis with other diseases that cause tegumentary lesions (Markle and Makhoul 2004; Schubach et al. 2008). For these reasons, the demonstration of the parasite confirms the infection and parasitological methods are essential in this context (Reithinger et al. 2007; Brazil 2007).

Direct investigation for *Leishmania* amastigotes can be done in clinical material obtained from the lesions through scraping procedure (Naiff 1996), needle aspiration (Kassi et al. 2004), imprint with tissue fragments (Marzochi and Marzochi 1994) or still through slit skin smear, known as Tzanck test ( Durdu et al. 2009; Bensoussan et al. 2006; ul Bari and ber Rahman 2006) or collection with dental broach (Griffiths and Dutz 1975; Navin et al. 1990). All mentioned methods employ preparations on glass slides, fixed and stained with Romanowsky-derived mixtures. The sensitivity of these methods varies greatly and is conditioned to several factors, among which, the parasite load, lesion evolution time, site where the parasite is investigated, quality of the collected material and the experience of the responsible technician (Brustoloni et al. 2007; Al-Jitawi et al. 1995).

In Brazil, ATL is a growing disease with cases and vectors being reported throughout the country (Brazil 2007) and, although laboratory diagnosis employs tools with different complexities, the application of these tools depends on the infrastructure and local resources of the affected regions. In some Brazilian regions is still common ATL diagnosis based only on the clinical presentation of lesions, supported by the intradermal reaction of Montenegro (IDRM). However, these evidences are not sufficient to confirm the diagnosis in areas with overlapping of etiological agents with similar clinical presentation. For this reason, the Brazilian Ministry of Health has been concentrating its efforts on the implementation of direct examination as a tool to support ATL diagnosis mainly because they are methods of simple execution and low operational cost. However, it is essential that such methods are standardized and their sensitivity indices known, so they can be safely applied throughout the country.

In this manner, considering the importance of parasitological methods for ATL diagnosis, we sought to standardize the collection and reading methods of the scraping procedure, compare its sensitivity when employed in two lesion sites (outer and inner edge) and, to assess the sensitivity of the direct methods (imprint and scraping) against the reference standard technique (isolation in culture) in a group of patients treated at the Laboratory of Leishmaniasis Surveillance of the Evandro Chagas Clinical Research Institute of the Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil (VigiLeish/IPEC/FIOCRUZ).

## Materials and methods

### *Patients*

The study population consisted of 110 patients with ulcerated lesions consistent with ATL treated at the Laboratory of Leishmaniasis Surveillance (VigiLeish) - Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil in the period 2009-2010. The routine protocol of this study was submitted and approved by the Ethics in Research Committee of the IPEC/FIOCRUZ under n° 0033.0.009.000-09. All participants signed a free and clarified consent term.

The calculated sample size was of at least 102 patients, obtained from previous results of this study (considering 70% positivity between imprint and culture and 62.5% and 43.5% for the scraping procedure and culture) with a significance level of 5% and 80% power.

### *Scraping procedure*

This procedure was conducted with the help of a escapel blade, number 11 (Embramed, São Paulo, Brazil) in two lesion sites: outer edge (OE) and inner edge (IE) (Figure 1a) which were smoothly scraped and the material smeared onto a glass slide with 12 delimited areas, whose preparation followed a standardized sequence (Figure 1b). Each area has 6mm and corresponds to 250 microscopic fields, totaling 3000 fields per slide (x1000). The procedure was performed without hemostasis at both edges and the occurrence of bleeding was registered, being considered positive when it was necessary to interrupt the procedure twice to stop bleeding with the aid of compression with gauze.

At the end of each procedure conducted in OE and IE, the patient indicated the level of pain, through a visual analog scale card ranging from 0 - 10 (CFDIS Association of America 2010), where the interval 0-2 was considered as "minimum" pain intensity; 3-5 as "medium"; 6-8 "moderate" and 9-10 "worst possible". The slides were fixed with methyl alcohol reagent (Vetec, Duque de Caxias, Brazil) and when completely dry were stained with Giemsa (Merck, Darmstadt, Germany).

Slide reading was performed with an oil immersion objective (x1000) (Eclipse E200 Microscope - Nikon, China) following the same sequence indicated in the diagram of figure 1b, registering the delimited area where the first parasite was found.

### *Biopsy*

Biopsy was performed at the edge of the skin lesion, after anesthesia with 2 % lidocaine, removing a fragment of about 5 mm considering the same scraping place in OE and IE (figure 1a). The sample was divided into two fragments, for imprint and isolation in culture.

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

#### *Imprint*

The imprint was prepared by performing soft compressions of the tissue fragment on the slide delimited areas, maintaining the same sequence shown in figure 1b. Slide fixation, staining and examination were conducted as described for the scraping procedure

The same technician prepared and examined scraping and imprint slides to avoid variations in the way of collecting and reading.

#### *Isolation in culture and identification of Leishmania by Multilocus enzyme eletrophoresis (MLEE)*

Parasite isolation was performed from the culture of the biopsy fragment in biphasic culture medium NNN (Novy-Neal-Nicolle) and Schneider's *Drosophila* medium (Sigma, Steinhein, Germany) containing 10% of fetal calf serum (Cultilab, São Paulo, Brazil) and used as reference method. After inoculation of the samples, the media were incubated at 26 - 28°C, and weekly examined during a maximum of 30 days (Madeira et al. 2006).

All isolates obtained were characterized through enzyme electrophoresis (Cupolillo et al. 1994), using six enzyme systems: 6PGDH (6-phosphogluconate dehydrogenase, EC.1.1.1.43); GPI (phosphoglucose isomerase, EC.5.3.1.9) ; NH (nucleoside hydrolase, 2 loci, EC. 3.2.2.1); G6PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC.1.1.1.49) and PGM (phosphoglucomutase, EC. 1.4.1.9) – (Sigma, Steinhein, Germany). Reference strains of *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) and *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) were used in all electrophoretic runs.

#### *Analysis of results*

The analysis of results considered the total group of patients included in the study (TG) and the subgroup of patients with final diagnosis of leishmaniasis (LG).

The exploratory data analysis was performed using frequencies of qualitative variables: final diagnosis, place of residence, sex, number of lesions (1 lesion, 3 lesions and up to 3 lesions), duration of lesions (1-3 months and over 3 months), location of lesions, occurrence of bleeding and pain intensity (range 0-10) for the scraping procedure. The age of patients was expressed through the media.

Fisher exact test was used to evaluate the association between the occurrence of bleeding and the site of scraping (OE and IE). Only the subgroup with leishmaniasis (LG) was considered in the evaluation of the relation between time of evolution of the lesion and imprint or scraping result (positive or negative).

Wilcoxon test was employed to evaluate the association between intensity of pain and site of scraping (OE and IE).

To determine the positivity of direct examination in relation to the number of microscopic fields examined, the delimited area of the slide where the first amastigote was found was established as cut off point. The cumulative total of positive cases ( $N_{decum}$ ) in relation to the number of delimited areas

1  
2  
3 examined was expressed in percentage (%), allowing the determination of a minimum number of  
4 microscopic fields to be examined.

5  
6 Simple kappa statistics with strength of agreement classified according criteria of Landis and Koch  
7 (Landis and Koch 1977):  $k \leq 0.20$  (poor agreement);  $0.21 \leq k \leq 0.40$  (slight);  $0.41 \leq k \leq 0.60$  (moderate);  
8  $0.61 \leq k \leq 0.80$  (substantial) and  $k > 0.80$  (almost perfect) and simple agreement were used to assess  
9 agreement between direct examination (imprint and scraping) and culture.

10  
11  
12 The test accuracy parameters used in this study: sensitivity, specificity, simple agreement, Kappa,  
13 positive predictive value (PPV) and negative (NPV) were calculated using *Statistical Package for the*  
14 *Social Sciences (SPSS)*, version 16.0 software.

15  
16 P-values  $< 0.05$  indicated associations statistically significant.

## 17 18 19 Results

20  
21  
22 The mean age of the 110 patients evaluated was 39.91 (36.4 – 43.3) years for the total group (TG) and  
23 37.6 (31.8-43.4) for the subgroup with ATL diagnosis (LG). Leishmaniasis was confirmed in 36.4%  
24 (n=40) patients through culture, test that was considered as reference standard. Sporothrichosis was  
25 diagnosed in 17.3% (n=19) patients; pyodermitis in 16.4% (n=18); ulcers with vascular etiology in 8.2%  
26 (n=9) and in 21.7% patients (n=24) other diseases. Most patients were from the state of Rio de Janeiro,  
27 and from these 38 were confirmed with ATL. Two patients (2%) were from other Brazilian states (Bahia  
28 and Maranhão), and these were also confirmed with ATL. Other variables that were assessed for both  
29 groups are presented in table 1.

30  
31 From 40 ATL cases, 39 were caused by *Leishmania braziliensis* and one by *Leishmania*  
32 *amazonensis*.

33  
34 The imprint was positive in 28 patients and the scraping procedure performed in OE was positive in  
35 17 patients and in IE in 25, showing diagnosis sensitivity for ATL of 70.0%, 42.5% and 62.5%,  
36 respectively. When the positivity of the three direct examinations was combined, the sensitivity value  
37 reached 77.5%. By definition, the parasitological exams are considered 100% specific (Faber et al. 2003).  
38 Other parameters (simple agreement, kappa, positive predictive value (PPV) and negative (NPV) are  
39 presented in table 2.

40  
41 There was higher occurrence of bleeding when scraping was conducted in the lesion OE ( $p < 0.05$ ).  
42 No statistical difference was found between time of lesion evolution and positivity of direct exams  
43 (imprint and scraping); or between pain intensity and site of the scraping procedure (OE and IE) ( $p > 0.05$ ).  
44

45  
46 The positivity of the direct exams (imprint, and scraping in OE and IE) in relation to the number of  
47 delimited areas examined in the slide showed that readings of around 1500 microscopic fields are enough  
48 to conclude 93% and 92% of the cases that were positive for imprint and scraping in IE, respectively.  
49 These results are presented in table 3.  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Discussion

In this study, we compared the sensitivity of imprint and scraping procedure conducted at two different sites of the lesion (OE and IE) against the reference standard (isolation in culture) for ATL diagnosis in a group of 110 patients. Tegumentary leishmaniasis was diagnosed in 40 patients, from which 39 cases were caused by *Leishmania braziliensis* and one by *L. amazonensis*. In the municipality of Rio de Janeiro, *L. braziliensis* is the species with highest prevalence of cases of ATL (Marzochi and Marzochi 1994; Oliveira-neto et al. 2000) and our results confirm this observation. Although *L. amazonensis* was recently reported in this city (Azeredo-Coutinho et al. 2007), the only case described in this study was obtained from a patient from the state of Maranhão. This result emphasizes the importance of etiologic characterization for the surveillance and monitoring of *Leishmania* species that are endemic in different regions of the country and that may be migrating accompanying human dislocation.

Direct cytological examinations, although of great applicability for the diagnosis of ATL are referred as low sensitivity methods. In this study, we found sensitivity values of 70.0% for imprint and 42.5% and 62.5% for the scraping procedure conducted in OE and IE respectively. When these three exams were associated they yielded a sensitivity of 77.5%, demonstrating that the association of different methods tends to increase the diagnostic sensitivity (Ramirez et al. 2000).

The sensitivity parameters of the direct exams found in literature are widely varied presenting indices from 32.7% (Weigle et al. 1987) to 90.0% (Ramirez et al. 2000). But this variation may be related to several factors such as time of lesion evolution, *Leishmania* species responsible for the case, parasite load, site of the lesion where the parasite is investigated, experience of the responsible technician and number of microscopic fields and/ or slides examined (Brustoloni et al. 2007). However, this information is not always supplied in the reports, making more difficult the comparison of the results among different authors. In this study, when we compared the results of the scraping procedure conducted in two different sites of the lesion, we observed different accuracy indices, which demonstrate that the site of the lesion where the samples are collected is an important aspect to be considered as has already been mentioned in literature (Ramirez et al. 2002, 2000). In this respect, another important aspect is the number of microscopic fields examined to report the results. Navin et al. (1990) observed a substantial increase in rates of positivity, proportional to the number of slides examined. In our study, the criteria used to make the slides and the readings indicated that about 1500 microscopic fields was sufficient to conclude 93% and 92% of the cases that were positive for the imprint and the scraping in IE, respectively. Direct examinations usually take some time, then above data is relevant when we consider the demand of the laboratories that conduct these examinations as diagnosis routine, and the need to optimize the time spent with slide readings, decreasing the weariness of the professional responsible for the diagnosis.

Although the scraping procedure is widely employed in ATL diagnosis, we could not find in the literature any mention to the intensity of the pain generated by the procedure, once it is used without anesthesia. In this study, this aspect was assessed and we demonstrated that the intensity of the pain informed by the patient was similar when the scraping procedure was conducted in OE or IE of the lesion. The procedure was well accepted by most patients and easy to conduct in individuals of different ages and even with lesions localized in areas with greater sensitivity.

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

Unlike the analysis of pain, a fact that is related to the welfare of the patient, the occurrence of bleeding is an important aspect in the quality of the material collected for direct examination. Bleeding was more frequent when scraping was conducted in OE than when performed in IE, probably because in OE it was necessary to rupture the tissue to collect the material, affecting small blood vessels. When scraping was conducted in IE, the collection was easy, obtaining richer cellular material and with few red blood cells, which facilitated microscopic examination. The inner edge was the site of the lesion that presented highest sensitivity for finding amastigotes when compared to OE.

The time of the evolution of ATL lesions is also considered a factor that interferes the sensitivity of parasitological examinations (Ramirez et al. 2000). Although we found higher positivity in recent lesions (1 – 3 months), when these results were statistically analyzed no association was found among these parameters (time of evolution and a positive test), in disagreement with literature. It is important to consider that the time of lesion evolution was informed by the patients being therefore a subjective one and often the early symptoms may go unnoticed by them.

Although the method presents good sensitivity, isolation of the parasite in culture has as inconvenience the need for specific reagents and equipment, not always available in endemic areas, besides the possibility of contamination. Thus, it is always important to consider other etiologies such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Sporotrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis* and several bacteria that can cause tegumentary lesion that may be circulating concurrently in the same endemic area. In this study, 70 cases of skin lesions had other diagnoses. As an example, 19 patients were diagnosed as sporotrichosis and the cultures of 9 presented fungal growth, which may be a warning signal for the differential diagnosis of ATL. Likewise, the presence of fungal elements on direct examination may also lead to confusion with *Leishmania* amastigotes. We recently published an article demonstrating the presence of several structures that could be confused with amastigotes by an inexperienced examiner (Mello et al. 2010). Thus, even after standardization of the scraping technique, the training of personnel is extremely important because it may be a source of false-negatives or false-positives results.

Since early diagnosis is one of the most effective measures for infection control, adoption of efficient and low cost methods is essential, principally at primary levels of care (Szargiki et al. 2009). Accuracy parameters presented in this study indicate that direct methods can be used safely in the diagnosis of ATL, in particular, the scraping procedure in IE, due to the ease of conduction and low cost of the examination, besides allowing repetitions at different times, increasing the chance to find the parasite, helping to confirm and solve ATL cases.

**Acknowledgments** The authors thank the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) – E26/ 110.892/2009 and the Evandro Chagas Research Institute (IPEC – Fiocruz) for their financial support.

## References

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 Al-Jitawi SA, Farraj SE, Ramahi SA (1995) Conventional scraping versus fine needle aspiration cytology  
8 in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta cytol* 39:82-84
- 9 Azeredo-Coutinho RB, Conceicao-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco  
10 RS, Valeti-Rosalino CM, Mendonca SC (2007) First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and  
11 leishmania amazonensis infection in Rio de Janeiro state, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*  
12 101:735-737
- 13 Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL (2006) Comparison of PCR assays for  
14 diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 44:1435-1439
- 15 Brasil (2007) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância  
16 Epidemiológica. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília-DF,  
17 Ministério da Saúde pp 1-180
- 18 Brustoloni YM, Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, Pontes ER, Oliveira AL, Hillebrand L, Ribeiro LF  
19 (2007) Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of  
20 the center-west region of Brazil. *Braz J Infect Dis* 11:106-109
- 21 Cupolillo E, Grimaldi G, Jr., Momen H (1994) A general classification of new world leishmania using  
22 numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50:296-311
- 23 CFDIS Association of America (2010) Assessing and Documenting Impairment in CFS  
24 <http://www.cfids.org/ok/impairment.pdf>. Accessed 20 December 2010
- 25 Durdu M, Baba M, Seckin D (2009) More experiences with the tzanck smear test: Cytologic findings in  
26 cutaneous granulomatous disorders. *J Am Acad Dermatol* 61:441-450
- 27 Faber WR, Oskan L, Gool TV, Kroon NCM, Kenegt-junk KJ (2003) Value of diagnostic techniques for  
28 cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 49:70-4
- 29 Griffiths WA, Dutz W (1975) Repeated tissue sampling with a dental broach. A trial in cutaneous  
30 leishmaniasis. *Br J Dermatol* 93:43-45
- 31 Kassi M, Tareen I, Qazi A, Kasi PM (2004) Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous  
32 leishmaniasis. *Ann Saudi med* 24:93-97
- 33 Landis JR, Koch GG (1977) An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of  
34 majority agreement among multiple observers. *Biometrics* 33:363-374
- 35 Madeira MF, Schubach A, Schubach TM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista  
36 C, Marzochi MC (2006) Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania*  
37 (*Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop*  
38 *Med Hyg* 100:442-445
- 39 Markle WH, Makhoul K (2004) Cutaneous leishmaniasis: Recognition and treatment. *Am Fam Physician*  
40 69:1455-1460
- 41 Marzochi MC, Marzochi KB (1994) Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: Emerging  
42 anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 10:359-375
- 43 Mello CX, Schubach A, Madeira MF (2010) Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the  
44 direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis? *Rev Soc Bras Med Trop In*  
45 *press*
- 46 Naiff RD (1996) A scarifier for obtaining specimens for diagnosis of leishmaniasis and other skin  
47 infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92:87
- 48 Navin TR, Arana FE, de Mérida AM, Arana BA, Castillo AL, Silvers DN (1990) Cutaneous  
49 leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic methods. *Am J Trop Med Hyg* 42:36-42
- 50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
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

Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Gonçalves-Costa SC, Souza CF, Grimaldi G Jr (2000) Mucosal leishmaniasis ("espundia") responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 42:321-325

Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Vélez ID (2000) Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: The sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. *J Clin Microbiol* 38:3768-3773

Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker DC, Vélez ID (2002) The method used to sample ulcers influences the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96:169-171

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7:581-96

Szargiki R, Castro EA, Luz E, Kowalthuk W, Machado AM, Thomaz-Soccol V (2009) Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis* 13:47-52

Schubach A, Barros MB, Wanke B (2008) Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis* 21:129-133

Weigle KA, de Davalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'Alessandro A (1987) Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: A comparison of seven methods. *Am J Trop Med Hyg* 36:489-496

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

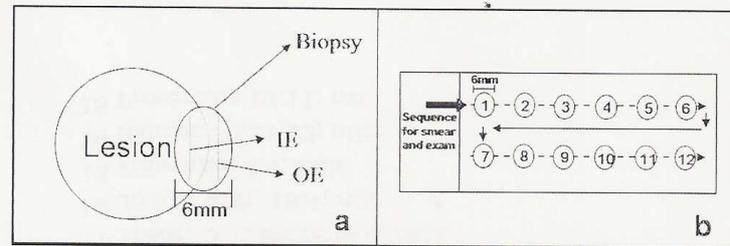


Fig. 1 **a** Diagram of the local of the lesion where the scraping procedure in outer edge (OE) and inner edge (IE), biopsy for culture and imprint were conducted. **b** Diagram of the microscopy slide with 12 delimited areas used in the direct examinations (imprint and scraping). Each area has 6mm and corresponds to 250 microscopic fields ( $\times 1000$ )  
152x50mm (150 x 150 DPI)

**Table 1** Variables assessed in the group of total patients studied (TG;n=110) and subgroup of patients with diagnoses of tegumentary leishmaniasis (LG; n=40), treated at the outpatient clinic of the Laboratory of Leishmaniasis Surveillance of the Evandro Chagas Clinical Research Institute, RJ (2009-2010)

Variables	Results for group	
	Leishmaniasis Group (n=40) % (n)	Total Group (n=110) % (n)
Sex		
Female	30,0 (12)	59,1 (65)
Male	70,0 (28)	40,9 (45)
Number of lesions		
1-3 lesions	85,0 (34)	92,8 (102)
Up to 3 lesions	15,0 (6)	7,3 (8)
Duration of lesions		
1-3 months	65,0 (24)	62,7 (69)
Over 3 months	35,0 (14)	36,4 (40)
no information*	0	0,9 (1)
Location of lesions		
Face/Neck	12,5 (5)	7,3 (8)
Arms	55,0 (22)	6,4 (7)
Legs	25,0 (10)	34,5 (8)
Body	7,5 (3)	51,8 (57)
Occurrence of bleeding during scraping - OE		
Yes	70,0 (28)	58,2 (64)
No	30,0 (12)	41,8 (46)
Occurrence of bleeding during scraping - IE		
Yes	30,0 (12)	25,0 (28)
No	70,0 (28)	75,0 (82)
Pain intensity - OE**		
0-2	75,0 (30)	72,7 (80)
3-5	25,0 (10)	20,9 (23)
6-8	0,0 (0)	4,5 (5)
9-10	0,0 (0)	1,8 (2)
Pain intensity - IE**		
0-2	65,0 (26)	64,5 (71)
3-5	25,0 (10)	25,5 (28)
6-8	2,5 (1)	4,5 (5)
9-10	7,5 (3)	5,5 (6)

\* 1 patient was unable to specify the time of lesion evolution

\*\* Evaluation through visual analog scale (0-10 points)

OE - out edge of lesion; IE - inner edge of lesion

**Table 2** Sensitivity, simple agreement, Kappa, positive predictive value (PPV) and negative (NPV) for the techniques of imprint and scraping in the outer edge (OE) and inner edge (IE) of the lesion applied to 110 patients treated at the Evandro Chagas Clinical research Institute, RJ (2009-2010)

Technics	Sensitivity (IC:95%)	Simple agreement	Kappa	PPV	NPV
Imprint	70,0% (61,4-78,5)	87,2%	0,730	100,0%	81,8%
Scraping					
OE	42,5% (33,3-51,7)	75,5%	0,461	100,0%	70,1%
IE	62,5% (53,4-71,5)	84,0%	0,659	100,0%	78,2 %

**Table 3** Relation between areas examined and positive results for direct examination (imprint and scraping in OE and IE) in a group of patients with positive direct examination (imprint or scraping) treated at the Evandro Chagas Clinical research Institute, RJ (2009-2010)

Delimited areas* (number of microscopies fields)	Direct exams					
	Imprint		Scraping			
			OE		IE	
	$n^{accum}$	%	$n^{accum}$	%	$n^{accum}$	%
1 (250)	12	42,9	9	52,9	14	56,0
2 (500)	16	57,1	12	70,6	15	60,0
3 (750)	19	67,9	12	70,6	17	68,0
4 (1000)	23	82,1	12	70,6	21	84,0
5 (1520)	24	85,7	13	76,5	23	92,0
6 (1500)	26	92,9	14	82,4	23	92,0
7 (1750)	26	92,9	14	82,4	24	96,0
8 (2000)	26	96,4	16	94,1	24	100,0
9 (2250)	27	96,4	16	94,1	25	100,0
10 (2500)	27	96,4	16	94,1	25	100,0
11 (2750)	27	96,4	16	94,1	25	100,0
12 (3000)	28	100,0	17	100,0	25	100,0

\*Corresponds to the area of the slide shown in figure 1. Each area corresponds to 250 microscopic fields (x 1000). OE - outer edge; IE - inner edge

$N^{accum}$ : number of cumulated positive cases in relation to number of delimited areas examined