

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

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

Avaliação da contribuição dos exames diretos para o
diagnóstico das leishmanioses

CINTIA XAVIER DE MELLO

RIO DE JANEIRO
2015

Avaliação da contribuição dos exames diretos para o diagnóstico das leishmanioses

CINTIA XAVIER DE MELLO

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para a obtenção de grau de Doutor em Ciências.
Orientado pela Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira

RIO DE JANEIRO
2015

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

Avaliação da contribuição dos exames diretos para o
diagnóstico das leishmanioses

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
para a obtenção de grau de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach (Presidente)

Doutor em Doutorado em Biologia Parasitária

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz

Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes (Membro)

Doutor em Biologia Parasitária

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz

Prof. Dr. Maria Inês Pimentel (Membro)

Doutor em Medicina

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz

Prof. Dr. Juliana Helena da Silva Barros (Membro)

Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Prof. Dr. Verônica Figueiredo do Amaral (Membro)

Doutor em Biologia Celular e Molecular

Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. Aline Fangundes da Silva (Suplente)

Doutor em Vigilância Sanitária

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fiocruz

A Deus

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que tem me surpreendido, suprido todas as minhas necessidades e realizado os meus sonhos. Ele colocou todos os anjos que estão nesses agradecimentos para possibilitar o cumprimento da promessa dEle na minha vida.

A toda a **minha família**, em especial minha **mãe**, por todas as orações e pela “lavagem cerebral” que fez em mim durante a infância, que me motivou a caminhar e chegar tão longe...

Ao **Sr. Robson Reis** e **Sr. Joaquim Pereira**, que foram verdadeiros pais para mim, investiram na minha formação com conhecimento, incentivo, oportunidades e muitas vezes com recursos financeiros. Vocês foram importantes não só profissionalmente, mas na minha formação como ser humano!

A **Aline Fagundes**, que durante a sua gestão no laboratório de Parasitologia acreditou em mim e me contratou como colaboradora, possibilitando a continuidade da minha história na Fiocruz.

A minha orientadora, **Dr^a Fátima Madeira**, pela generosidade que demonstrou durante todos esses anos de relacionamento, me permitindo alçar vôos cada vez mais altos e até mesmo sair do ninho... Eu tenho uma dívida de gratidão com você!

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

Ao querido **Sidnei da Silva**, pelos conselhos, apoio, aulas, conversas e – claro – repreensões!

Ao **Luan Hugolino** e **Caio Thomaz**, alunos de iniciação científica que me ajudaram no desenvolvimento desse projeto e me ensinaram a ensinar! Foi uma ótima experiência!

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

A **Dr^a Raquel Vasconcelos**, por toda a análise estatística, pela paciência e prontidão em me auxiliar.

Aos que sempre torceram por mim, aos que passaram pela minha vida e me influenciaram e ensinaram. Sei que estão comemorando comigo essa conquista.

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água no
mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse
uma gota”

(Madre Teresa de Calcuta)

de Mello, C.X. **Avaliação da contribuição do exame direto para o diagnóstico das leishmanioses.** Rio de Janeiro, 2015. 95f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas] Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas.

RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças complexas cujo diagnóstico nem sempre é uma tarefa fácil. Nesse contexto, os exames parasitológicos diretos representam uma abordagem importante, por serem métodos de confirmação, de fácil execução, baixo custo e fornecerem respostas rápidas. Esta tese objetivou avaliar a utilidade dos exames diretos para o diagnóstico das leishmanioses através de: a) produção de material informativo envolvendo aspectos morfológicos do parasito; b) Descrição do uso dos exames parasitológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina e, c) proposição de alternativas para concentração de espécime clínico como a citocentrifugação e a gota espessa para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral canina. A população de estudo envolveu pacientes humanos com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e visceral (LV) e cães sororetores eutanasiados segundo recomendação do ministério da saúde para o controle da LV. Os resultados são apresentados por meio de seis artigos, além de “resultados preliminares” que apontam a utilidade de raspados de lesão, aplicados à citocentrifugação como alternativas interessantes para o exame direto da LTA. Os artigos abordam aspectos do exame direto da LTA (nº 1 e 2) e mostram a expansão da LV no estado do Rio de Janeiro, valorizando a importância do exame direto na elucidação de parte dos casos (nº 3, 4, 5 e 6). Além disso, nosso trabalho confirmou que *Leishmania chagasi* é o agente responsável pelos casos de LV em Barra Mansa (RJ). O artigo 6 apresenta a utilidade da gota espessa na confirmação parasitológica de cães sororetadores. Os exames diretos são métodos negligenciados e o nosso estudo evidenciou o valor desses exames, contribuindo também, com alternativas para concentração do material clínico como a gota espessa que apresentou excelente desempenho e valores de sensibilidade e certamente poderá dar maior agilidade nas etapas de processamento e de leitura desses exames.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Leishmaniose visceral canina 3. Leishmaniose visceral humana. 4. Exame direto. 5. Diagnóstico parasitológico.

Mello, C.X. Evaluation of the contribution of direct examination for the diagnosis of leishmaniasis. Rio de Janeiro, 2015 95f. Thesis [Doctor Degree in Clinical Research in Infectious Diseases] National Institute of Infectology Evandro Chagas.

ABSTRACT

The clinical diagnosis of leishmaniasis remains a daunting and challenging task. In addition, the direct parasitological examination prevails as the gold standard for diagnosis, due to its potential advantages including cost, availability and feasibility. Thus, the aim of the current thesis was to evaluate the contribution of microscopic examination for the diagnosis of Leishmaniasis through the: a) production of information material regarding morphology of the parasite; b) Description of the use of parasitological tests for the diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis; c) Proposition of alternatives to clinical specimen concentration as cytocentrifugation and thick smear for the diagnosis of canine American tegumentary and visceral leishmaniasis. We enrolled consented patients with confirmed diagnosis of American tegumentary leishmaniasis (ATL) or visceral leishmaniasis (VL). Besides, euthanized seropositive dogs were also included. Our findings were published in 6 distinct papers. Papers I and II approaches aspects of the direct exam of ATL and papers III, IV, V and VI showed the dramatic changes observed in epidemiology of VL in the state of Rio de Janeiro, showing the importance of the direct exam. In addition, our work confirmed that *Leishmania chagasi* is the responsible agent for the cases of VL in Barra Mansa (RJ). Paper VI shows the use of the thick smear on parasitological confirmed seroreactors dogs. The direct examinations are neglected methods and our study aimed to highlight the value of these tests, also contributing with alternatives for concentration of clinical material as thick smear, that showed excellent performance and sensitivity that will surely provide greater flexibility in processing steps and microscopic observation of these tests.

Key words: 1. American tegumentary leishmaniasis. 2. Canine visceral leishmaniasis 2. Direct examination. 3. Human visceral leishmaniasis. 4. Direct exam 5. Parasitological Diagnosis.

LISTA DE QUADROS, TABELAS E ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1 Resultados dos 42 pacientes estudados relacionados ao diagnóstico parasitológico e diagnóstico final atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI, FIOCRUZ, RJ) no período de Abril/2012 a Novembro/2013.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
DNA – Ácido desoxirribonucléico
ELISA – (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Ensaio imunoenzimático indireto
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
kDNA – DNA do cinetoplasto
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LT – Leishmaniose tegumentar
LV – Leishmaniose visceral
LVC – Leishmaniose visceral canina
mL – Mililitro
mg – Miligrama
NNN – Meio de cultura de Novy, Nicolle e McNeal
MO - Medula óssea
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
RPM – Rotações por minuto
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SES/RJ – Secretaria de estado de saúde do Rio de Janeiro
SFM– Sistema fagocítico mononuclear
SPSS – Pacote estatístico para as ciências sociais
U – Unidades
LapClinVigileish – Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
µg – Micrograma
µL – Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.2.	DIAGNÓSTICO.....	6
1.3.	EXAME DIRETO	10
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	GERAL.....	16
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1.	DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO	17
3.2.	ASPECTOS ÉTICOS.....	17
3.3.	PRODUÇÃO DE MATERIAL INFORMATIVO	17
3.4.	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EMPREGADOS NO ESTUDO	18
3.4.1.	Cultura.....	18
3.4.2.	Exames diretos.....	19
3.5.	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	21
4.	RESULTADOS.....	22
4.1.	ARTIGO 1.....	23
4.2.	ARTIGO 2.....	27
4.3.	ARTIGO 3.....	35
4.4.	ARTIGO 4.....	40
4.5.	ARTIGO 5.....	44
4.6.	ARTIGO 6.....	48
4.7.	OUTROS RESULTADOS.....	725
5.	DISCUSSÃO.....	77
6.	CONCLUSÕES	85

1. INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSES: CONSIDERAÇÕES GERAIS

As leishmanioses constituem um grupo de doenças infecciosas de transmissão vetorial, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* acometendo o homem e animais. São doenças negligenciadas que constituem um grave problema em saúde pública, ocupando lugar de destaque entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010)

O gênero *Leishmania* foi descrito por RONALD ROSS em 1903 e atualmente conta com várias 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. Os parasitos do gênero *Leishmania* estão classificados nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, cujo ciclo biológico heteroxênico compreende formas promastigotas e amastigotas (LAINSON & SHAW, 1987). As formas promastigotas são flagelados que se desenvolvem no trato alimentar dos insetos vetores e as formas amastigotas não possuem flagelo livre e parasitam células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado. Ambas as formas multiplicam-se por divisão binária. A transmissão da doença é realizada pela picada de fêmeas de insetos flebotômíneos que, em regiões do novo mundo, são classificadas no gênero *Lutzomia* (FRANÇA, 1924; ELMHALLAWY et al., 2014; READY, 2014).

Esses protozoários são organismos complexos, pois embora possuam características biológicas, bioquímicas e imunológicas semelhantes, geram no hospedeiro vertebrado, uma variedade de manifestações clínicas. As diferentes manifestações clínicas são dependentes de determinadas características da resposta imune dos hospedeiros vertebrados e dos distintos

tropismos das espécies envolvidas na infecção, causando dois grupos de doenças distintas, a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) (ELMAHALLAWY et al., 2014).

Ambas as doenças estão em expansão 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 98 países ao redor do mundo (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; ALVAR et al. 2012).

Nas Américas, as diferentes apresentações clínicas das formas tegumentares são genericamente denominadas de leishmaniose tegumentar americana (LTA), para distingui-las das formas dermatópicas encontradas no Velho Mundo. A LTA está presente desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994). No Brasil, a LTA é registrada em todos os estados da federação, associada a sete espécies de *Leishmania*, sendo *Leishmania (V.) braziliensis* a espécie mais prevalente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

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, 2007). Devido à complexidade clínica, alguns autores sugerem que a classificação seja feita em grupos e subgrupo considerando diferentes abordagens. De maneira geral a LTA é classificada em duas formas: leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa.

No caso da leishmaniose cutânea a lesão geralmente se inicia com um eritema no local da picada do flebotomíneo, onde posteriormente se desenvolve uma pápula e então um nódulo que tende a ulcerar em cerca de duas semanas a dois meses. A ocorrência de infecção secundária pode causar dor local e produzir modificações no aspecto clássico da lesão. Por sua vez, a leishmaniose cutânea pode se apresentar de outras formas, como pápulas, placas, verrucosa, eczematóide, entre outras (VEGA-LÓPEZ, 2003). Tal diversidade de manifestações clínicas deve ser considerada no diagnóstico diferencial com outras doenças como a sífilis, hanseníase, paracoccidioidomicose, sarcoidose, cromoblastomicose, úlceras decorrentes da anemia falciforme, piodermites, tumores, vasculites, tuberculose, esporotricose etc. (MARKLE & MAKHOUL, 2004). 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.

A LV é uma forma grave desse grupo de doenças que ficou popularmente conhecida como calazar (febre negra), pelos sintomas de febre e escurecimento da pele dos indivíduos acometidos. Possui caráter endêmico e, no Brasil, a transmissão autóctone é registrada em praticamente todos os estados brasileiros. No ciclo de transmissão, o cão doméstico é um importante reservatório do agente, constituindo um dos principais alvos para o controle da doença.

Nas Américas a LV é causada pela espécie *L. chagasi* (sin *L. infantum*), sendo *Lu. longipalpis* o vetor com papel importante na dispersão do parasito (READY, 2014). O Brasil contribui com cerca de 90% dos casos das Américas fazendo com que a LV seja um problema de saúde pública real (LAURENTI, 2014). O número de cães infectados também é grande; na América do Sul é estimado em milhões, sendo que a Venezuela e o Brasil contribuem com as mais altas taxas de infecção desses animais (BANETH et al., 2008).

No Brasil, a doença tem se difundido com a maioria dos casos acontecendo nas Regiões Norte e Nordeste, e se antes apresentava um caráter primariamente rural agora revela padrões epidemiológicos com tendência à urbanização (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^a). A primeira epidemia urbana de leishmaniose visceral ocorreu em Teresina-PiauÍ, onde mais de 1000 casos da doença foram registrados no período de 1981-1986. Nos anos seguintes ocorreram epidemias em São Luís (Maranhão) e Montes Claros (Minas Gerais), Corumbá e Campo Grande (Mato Grosso do Sul), Belo Horizonte e outros (DRUMOND, 2011; COSTA, 2008). Atualmente, Belo Horizonte possui uma das maiores taxas de prevalência do Brasil (HARHAY et al., 2011) e a maior proporção de mortes (MARTINS-MELO, 2014).

A expansão geográfica da LV no Brasil é atribuída às modificações no ambiente, principalmente relacionada ao deflorestamento e aos elementos que envolvem o crescimento desordenado das cidades. Além disso, como no Brasil não existe controle no transporte de animais domésticos, as evidências epidemiológicas sugerem que a expansão geográfica da LV pode ser atribuída ao deslocamento de cães infectados para áreas onde o vetor já está instalado (ZUBEN et al., 2014, SILVA 2014^a). Nesse contexto, é importante citar a facilidade de *L. longipalpis* em se adaptar aos ambientes modificados (BRAZIL, 2013).

No estado do Rio de Janeiro, o primeiro caso autóctone de LV ocorreu em 1977, na capital do estado (MARZOCHI et al., 1981). A partir desse caso, associado a notificação de cães parasitologicamente positivos e a presença de *L. longipalpis* (SOUZA et al., 1981), foi

instituído oficialmente em 1980, pelo Ministério da Saúde a prática do inquérito canino, contemplando áreas restritas a este município.

O estado Rio de Janeiro é considerado uma área de transmissão esporádica de LV, segundo classificação adotada no manual de vigilância do Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^a). Embora casos humanos sejam escassos, casos caninos sempre foram diagnosticados em diversas áreas do município (MARZOCHI et al., 2009). Recentemente, tem-se notado a expansão desses casos caninos para diferentes regiões como Angra dos Reis e Mangaratiba (MADEIRA et al., 2006), Maricá (de PAULA et al., 2009), Cachoeira de Macacu (SILVA et al., 2011) e em áreas urbanas da capital, nos bairros de Laranjeiras (FIGUEIREDO et al., 2010) e Cajú (BRAZIL, 2013). Tais casos têm colocado os setores da vigilância epidemiológica em alerta, uma vez que em outras cidades do Brasil, como Campo Grande (Mato Grosso do Sul) e Belo Horizonte (Minas Gerais), atualmente consideradas áreas de transmissão intensa, casos caninos precederam espacial e temporalmente os casos humanos (BRAZIL et al., 2012).

A LV é uma doença progressiva e quando não tratada é geralmente fatal (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^b). Os parasitos se multiplicam em órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear e por isso o baço, fígado e medula óssea são altamente parasitados. No homem, a doença pode ser dividida em três fases: o período inicial, caracterizado por febre irregular, hepatoesplenomegalia e geralmente manutenção do estado geral. Na segunda fase, o período de estado, o paciente apresenta importante emagrecimento, anemia, leucopenia, trombocitopenia e intensificação da hepatoesplenomegalia. E no período final ocorrem a queda drástica do estado geral, febre, hemorragias e infecções secundárias que geralmente levam o paciente à morte. O curso completo da doença é muito variável e pode chegar até dois anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^b).

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com mononucleose, toxoplasmose e infecção por citomegalovírus na fase aguda e na apresentação clássica, com hepatoesplenomegalia maciça, devem ser avaliadas doenças como malária, febre tifóide, esquistossomose, infecção bacteriana intestinal prolongada e doenças reumáticas (de CAMPOS et al., 2013). Tendo em vista que as crianças são mais suscetíveis ao desenvolvimento de LV, é importante dar especial atenção para o diagnóstico diferencial com leucemia infantil, que constitui o câncer mais comum nesta faixa etária, já que ambas as doenças apresentam sinais e sintomas similares (de VASCONCELOS et al., 2014).

As manifestações clínicas associadas com risco para a morte incluem anasarca, edema de membros inferiores, dispnéia, epistaxe, sangramento gengival, petéquias, hematúria,

melena, icterícia e complicações infecciosas (DRUMOD et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^b). A diminuição da letalidade é um dos principais objetivos do programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral (PVCLV), entretanto, tal índice tem aumentado nos últimos anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^b; MARTINS-MELO, 2014). De 2000-2011 a LV causou mais de 2500 mortes no Brasil, sendo as maiores taxas de mortalidade nos grupos extremos de idade (menores de 1 ano e maiores de 70 anos). O nordeste, principal região endêmica do país, apresenta a maior taxa de mortalidade, duas vezes maior que a média nacional. Tal observação reflete a vulnerabilidade ambiental e social nessa região. Entretanto, a maior taxa de letalidade de LV tem sido registrada na região Sul, que é considerada não endêmica. Tal fato demonstra a expansão da LV para regiões antes indenes e o incorreto ou tardio diagnóstico devido a pouca experiência da equipe de saúde com relação à nova condição (MARTINS-MELO, 2014).

Vários fatores de risco têm sido associados ao desenvolvimento da LV humana, entre os quais estão o baixo nível educacional, a pobreza e a presença e intensidade de vegetação ao redor da moradia (READY, 2014; de ARAÚJO et al., 2013). Além desses fatores, a presença de cães infectados nas residências também é relatada, já que esse animal constitui o reservatório doméstico do agente causador da doença. Adicionalmente, estudos tem demonstrado uma dependência espacial positiva entre leishmaniose visceral humana e canina. Por conta disso, o controle dos cães infectados e a identificação de novas áreas de ocorrência são fundamentais para o controle da doença (ZUBEN et al., 2014, TEIXEIRA-NETO et al., 2014).

No cão, o desenvolvimento de doença tem também relação com o tipo de resposta imune. A baixa resposta imune celular e a presença de resposta humoral estão associadas ao aparecimento de sinais clínicos. Por sua vez, cães que apresentem uma boa resposta imune celular são considerados resistentes, embora eventos de imunossupressão possam gerar mudanças nesse status (SOLANO-GALLEGU, 2009). Cães que desenvolvem a doença podem manifestar uma grande variedade de sinais clínicos, como febre irregular, apatia, linfadenomegalia, diminuição do apetite, letargia, esplenomegalia, poliúria, lesões oculares, polidipsia, emagrecimento, descamação furfurácea e úlceras na pele, conjuntivite, paresia do trem posterior, fezes sanguinolentas e crescimento exagerado das unhas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^a; SOLCA et al., 2014; SOLANO-GALLEGU, 2009). Tal variedade de sintomatologia torna difícil o diagnóstico e controle da LVC (MARTINEZ et al., 2011).

Tradicionalmente os cães são classificados em assintomáticos, oligosintomáticos e polissintomáticos baseado no exame físico (MANCIANTI et al, 1988). Alguns autores têm

questionado essa abordagem pois a mesma desconsidera disfunções sem manifestações aparentes e propõem duas novas denominações: infecção clínica, aquela na qual o animal apresenta sinais clínicos e/ou anormalidades clínico patológicas e confirmação da presença de *L. chagasi* (*sin L. infantum*) e, infecção subclínica, definida como ausência de sinais clínicos, anormalidades clínico patológicas nos exames laboratoriais, mas com confirmação da presença de *L. chagasi* (*sin L. infantum*) (SOLANO–GALLEGO, 2009).

Nas áreas endêmicas, altas taxas de infecção são relatadas para os cães, com elevada frequência do encontro do parasito em pele íntegra (KULHS et al., 2011). Madeira et al. (2009) isolaram *L. chagasi* da pele íntegra em 74% de 394 cães sororeatores, e apenas 21,9% desses animais eram sintomáticos. A detecção de parasitos no tecido mais acessível ao vetor, a derme, ressalta o potencial de transmissão da leishmaniose por esses animais (MAIA et al., 2010).

No Brasil, diferente de outros países, o tratamento de cães com LV não é indicado pelo MS, baseado em estudos que mostraram que cães infectados sob tratamento nunca alcançam a cura parasitológica e o uso dos mesmos medicamentos utilizados no tratamento humano pode levar ao desenvolvimento de cepas resistentes (MAIA et al., 2010). No Brasil, uma das principais estratégias de controle é a identificação dos animais infectados através de métodos sorológicos e a eutanásia desses animais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^a). Essa medida tem sido criticada por alguns pesquisadores que alegam que os testes utilizados para o diagnóstico não apresentam boa sensibilidade e que apesar da eutanásia, o número de casos humanos e caninos não tem diminuído ao longo do tempo (QUINELL & COURTENAY, 2009; COSTA, 2011). Dificuldades como lentidão entre o diagnóstico e a retirada do cão, a baixa sensibilidade dos testes sorológicos, a resistência da população em entregar os animais para a eutanásia e a rápida substituição dos cães nas áreas endêmicas tem sido apontadas como fatores que contribuem para a pouca eficácia do programa de controle da LV (NUNES et al., 2008; MOREIRA et al., 2004; ROMERO & BOELAERT, 2010). É importante ressaltar que as ações para o controle da LV requerem complexa interação entre vários setores da saúde (BANETH, 2013).

1.2. DIAGNÓSTICO

Devido às características imunobiológicas e ao espectro de manifestações clínicas apresentadas pelas leishmanioses, o seu diagnóstico nem sempre é uma tarefa fácil. Por conta

disso o diagnóstico deve, sempre que possível, estar apoiado nos exames laboratoriais, aspectos clínicos e evidências epidemiológicas. Diversas técnicas laboratoriais podem ser utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses, no entanto, os espécimes clínicos utilizados irão variar em função da suspeita clínica da doença – se LTA ou LV.

NA LTA, a intradermorreação de Montenegro (IDRM) possui grande valor no diagnóstico, já que nesta doença a resposta é predominantemente do tipo celular (CARVALHO et al., 1995). Esse teste se tornou um dos mais utilizados na rotina ambulatorial para o diagnóstico da forma cutânea. 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 doenças. Em contrapartida, na LV devido a resposta imune humoral ser predominante, sobretudo na fase ativa da doença, a IDRM é negativa e se torna positiva somente após a cura (READY, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^a).

Semelhantemente à IDRM, que tem seu fundamento baseado na detecção de resposta imune celular, os métodos sorológicos são baseados na detecção da resposta imune humoral, ou seja, de anticorpos anti-*Leishmania* no soro humano. Na LTA devido aos baixos níveis séricos de anticorpos específicos essa ferramenta tem uso limitado para o diagnóstico (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Como já foi dito anteriormente, na LV há produção intensa de anticorpos por parte do hospedeiro e por isso o diagnóstico pode ser realizado através de tais métodos.

Para o diagnóstico sorológico são utilizados basicamente três métodos, o ensaio imunoenzimático (ELISA), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e os testes imunocromatográficos conhecidos também como testes rápidos. Para o diagnóstico humano, atualmente é utilizado RIFI empregando kit IFI – leishmaniose visceral humana[®] disponibilizado pelo Ministério da Saúde, considerando resultados positivos aqueles com titulação igual ou acima de 1:80. Com o objetivo de diminuir os índices de letalidade, o Ministério da Saúde tem orientado a utilização do teste imunocromatográfico (Kalazar Detect) visando dar maior agilidade no processo diagnóstico e instituição do tratamento. A literatura tem apresentado valores de sensibilidade de cerca de 85% para RIFI, e 99% para o teste imunocromatográfico. A especificidade para ambos os testes está em torno de 80% (BRUSTOLONI et al., 2007; MACHADO DE ASSIS et al., 2012).

O diagnóstico acurado da LVC ainda é um desafio e constitui um dos pilares para estratégia de controle da LV no Brasil. Por isso, os métodos diagnósticos devem ser exatos e capazes de diagnosticar tanto os animais sintomáticos como os assintomáticos. Sabe-se que a

validação de tais testes é difícil, pois não existe padrão de referência para a infecção em animais assintomáticos (ROMERO & BOELAERT, 2010).

Atualmente, para o diagnóstico da LVC são utilizados dois testes: o teste imunocromatográfico DPP[®] (Dual Path Platform) como triagem e ensaio imunoenzimático (EIE – leishmaniose visceral canina[®]) como teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; COURA-VITAL 2014, ZUBEN et al., 2014). Ambos os testes são produzidos por Biomanguinhos/FIOCRUZ e distribuídos pelo Ministério da Saúde. A literatura relata valores de sensibilidade em torno de 90% para o EIE[®] e especificidade variando de 70-90% (de ARRUDA et al., 2013; LAURENTI et al., 2014; COURA-VITAL et al., 2014, FIGUEIREDO et al., 2010^b). Para o DPP, estudos têm mostrado sensibilidade em torno de 80-90% e especificidade de 70-95% (LAURENTI et al., 2014, BRAGA et al., 2014, ZANETTE et al., 2013).

Apesar do DPP[®] apresentar uma elevada especificidade ainda são registradas reações cruzadas nos testes sorológicos com outros agentes como *Babesia canis vogeli*, *Dirofilaria immitis*, *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii* (LAURENTI et al., 2014, BRAGA et al., 2014, ZANETTE et al., 2013). À exceção da infecção por *T. cruzi*, os títulos sorológicos de animais infectados por outros agentes geralmente são baixos nos testes para leishmaniose e por conta disso a prática da eutanásia baseada em tais resultados tem sido questionada nesses casos específicos (ZANETTE et al., 2013).

Os exames histopatológicos também podem ser empregados para o diagnóstico das leishmanioses, tanto LTA como LV. Na LTA, é considerado pouco sensível devido à escassez parasitária nas lesões (DA-CRUZ & PIRMEZ, 2005), entretanto apresenta a vantagem de permitir um diagnóstico presuntivo baseado nas características do tecido mesmo quando o parasito não é encontrado (MIRÓ et al., 2008). 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). Já na LV, onde a medula óssea é o espécime de eleição, são observadas hiperplasia, granuloma, fibrose, nódulos linfóides benignos e necrose (BHATIA et al., 2011, CHANDRA et al., 2013).

Outra abordagem que pode ser utilizada são os testes parasitológicos, considerados de certeza ou definitivos, pois se baseiam na evidência direta do parasito no espécime clínico avaliado. Entre os testes parasitológicos a cultura é considerado o padrão de referência (de RUITER et al., 2014), pois permite a obtenção dos isolados que é uma etapa imprescindível

para a caracterização das espécies além do armazenamento das mesmas para utilização em estudos futuros. O isolamento em cultura consiste na inoculação de espécimes clínicos em meios de cultura que proporcionam a diferenciação e multiplicação do parasito, que é facilmente observado em exames a fresco por microscopia ótica. Os meios de cultura geralmente utilizados para esse fim são uma combinação de meio sólido NNN (Novy, MacNeal e Nicolle) com meio líquido, normalmente o meio Schneider's Insect Medium®, suplementado de soro fetal bovino (READY, 2014). Diferentes espécimes clínicos podem ser utilizados em função da doença (LTA ou LV) e do hospedeiro (homem ou cão).

A especificidade dos métodos parasitológicos por definição é 100% (FABER et al, 2003), e a sensibilidade para o isolamento em cultura varia entre 70-80% (FABER et al, 2003; LUZ et al, 2009; BRUSTOLONI et al, 2007)

O exame parasitológico também pode ser realizado através da pesquisa direta, no entanto este assunto será abordado no capítulo a seguir. As técnicas moleculares são alternativas aplicáveis no campo diagnóstico. A detecção de DNA parasitário, pela PCR, tem proporcionado o aumento da sensibilidade em relação aos métodos convencionais (AL-JAWABREH et al., 2006; SHAHBAZI et al, 2008). Diversos alvos têm sido utilizados; região do minicírculo do cinetoplasto (KDNA), espaço interno transcrito 1 (ITS1) e região do RNA ribossomal (rRNA) são os mais empregados e tem apresentado valores em torno de 95% de sensibilidade (MIRÓ et al., 2008, SOLCÀ et al., 2014, ELMAHALLAWY et al, 2014).

Adicionalmente a PCR pode ser aplicada em uma grande variedade de amostras clínicas tanto humanas quanto de animais, como lesão cutânea, medula óssea, pele, baço, fígado, linfonodo e sangue periférico. Com relação ao diagnóstico da LV, alguns estudos tem demonstrado que amostras de sangue apresentam níveis similares de acurácia comparadas a amostras de medula óssea, sendo a anterior uma amostra mais segura e menos invasiva (de RUITER, 2014). Entretanto, resultados positivos podem ser encontrados em indivíduos assintomáticos nas áreas endêmicas, indicando que a PCR sozinha é um marcador de infecção, mas não de doença. Por isso, seus resultados devem ser avaliados juntamente com outros critérios (de RUITER, 2014, DEBORGGRAEVE et al., 2008)

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 estas algumas 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 outros entraves que restringem seu emprego na rotina laboratorial, sendo mais utilizada em instituições de pesquisa e universidades.

Independente da técnica utilizada para o diagnóstico, a escolha do espécime clínico a ser investigado para confirmação parasitológica principalmente na LVC constitui um grande desafio. É sabido que a sensibilidade dos testes está intimamente relacionada ao sítio pesquisado, ao status clínico do cão e ao exame realizado (SILVA et al, 2014^b; COURAVITAL et al., 2014), entretanto, a literatura não apresenta um consenso com relação ao melhor sítio para pesquisa dos parasitos (de ALMEIDA et al., 2011; de ALMEIDA et al., 2013; MAIA et al., 2010; MOREIRA et al., 2007; MARTINEZ et al., 2011). Almeida et al. (2011; 2013) em uma mesma coorte encontraram melhores índices de sensibilidade na cultura em biópsia de medula óssea (cães assintomáticos) e pele (cães sintomáticos); já na técnica de PCR, os melhores resultados foram para punção de linfonodo. Tais resultados demonstram a influência dos fatores acima citados na sensibilidade dos métodos para diagnóstico. Os sítios geralmente descritos com melhores valores de sensibilidade são baço, linfonodo, medula óssea e em estágios mais avançados da doença, a pele (de ALMEIDA et al., 2011; de ALMEIDA et al., 2013; MAIA et al, 2010; MOREIRA et al, 2007; MARTINEZ et al, 2011; SOLCÀ et al., 2014).

1.3. EXAME DIRETO

Apesar de todos os avanços obtidos no campo do diagnóstico das leishmanioses a pesquisa direta de formas amastigotas de *Leishmania* permanece como primeira escolha para o diagnóstico definitivo desses agravos, principalmente em áreas com pouca infraestrutura, onde o baixo custo e a facilidade de execução e de implantação se tornam condições fundamentais na escolha dos métodos (UL BARI & RAHMAN et al., 2010; GUPTA & SINGHI, 2005; MINISTÉRIO DA SAUDE, 2007).

A pesquisa direta foi um dos primeiros métodos a serem utilizados para o diagnóstico das leishmanioses (SILVA, 1915). O método se baseia na pesquisa simples com necessidade de um mínimo de processamento, de formas amastigotas em espécime clínico, depositado em lâmina de vidro e corados por derivados do Romanowsky. A partir desse princípio básico algumas variações na obtenção de material para o exame direto foram descritas, sempre considerando a coleta da borda ativa da lesão e evitando ao máximo o excesso de sangue nas preparações (GUPTA & SINGHI, 2005).

A forma mais simples e barata é a escarificação de lesão cutânea (UL BARI et al., 2010; SILVA, 1915) que consiste em pesquisar o parasito em material obtido de raspados das lesões, realizados sem a necessidade de anestesia local. Tal procedimento pode ser realizado com auxílio de um bisturi de ponta fina ou com dispositivo patenteado especificamente para essa coleta (NAIFF, 1996).

Outro procedimento descrito é o método de Tzanck ou “slit skin smear”, descrito em 1947 (SCHNEIDER, 2010) para o diagnóstico de câncer de pele, herpes e dermatites e hoje largamente utilizado em doenças dermatológicas, incluindo as leishmanioses. Para obtenção do material, realiza-se um corte de profundidade de cerca de 3mm na borda da lesão, sendo o raspado coletado na superfície interna desse corte (SCHNEIDER, 2010; GUPTA & SINGHI, 2005; BENSOUSSAN et al., 2006; UL BARI et al., 2010; DURDU et al., 2009).

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 parasitos. A deposição do material na lâmina pode ser realizada diretamente ou com auxílio de uma gota de salina (UL BARI et al., 2010; GRIFFITHS & DUTZ, 1975; NAVIN, 1990).

A punção aspirativa também pode ser utilizada e consiste na aspiração de material da lesão através da inserção de uma agulha na base da lesão. Os autores têm demonstrado que essa técnica apresenta resultados melhores com relação à sensibilidade e menor coloração de fundo em relação à escarificação (HOSSEINAZEDEH et al, 2012 KASSI et al., 2004; AL JITAWI et al, 1995). Podem ainda ser utilizadas impressões com fragmentos de tecido (“imprint”), que têm como inconveniente a necessidade de realização de biópsia que é um procedimento privativo do profissional médico, pois envolve etapas de anestesia e sutura.

Recentemente foi descrita uma nova técnica para exame direto denominada “Press imprint smear”. Nessa técnica, um fragmento de cerca de 3mm da lesão é comprimido entre duas lâminas de vidro que posteriormente são fixadas e coradas, tal método apresentou sensibilidade de cerca de 85% (SOUSA et al., 2014).

Embora os exames diretos sejam métodos considerados de baixa complexidade, necessitam de recursos humanos capacitados e treinados, uma vez que o método é subjetivo, sendo influenciado pela experiência do profissional. Profissionais treinados e leituras cuidadosas são extremamente importantes, pois outros microrganismos podem estar presentes nas preparações, seja como contaminantes, seja como agente etiológico de outras doenças, podendo gerar confusão no diagnóstico.

Para identificar precisamente as formas amastigotas de *Leishmania* sp. devem ser observadas quatro principais características: o tamanho do parasito que varia entre 2-4µm, e a presença de uma membrana celular íntegra, núcleo e cinetoplasto, este último ligeiramente mais escuro que o núcleo e podendo se apresentar como uma barra cromática ou um ponto (DITTUS & SEMMEL, 2013; ARECHAVALA et al., 2010).

Estruturas leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* (SÃO THIAGO et al., 1998), de *Candida* sp e de *Sporothrix schenckii* podem ser confundidas com essas formas por um microscopista pouco experiente (de MELLO et al., 2011). A ausência de cinetoplasto e a visualização de um halo claro ao redor da estrutura (formado pela imagem negativa da parede celular que não se cora pelo Giemsa) são características que diferenciam amastigotas de *Leishmania* de estruturas leveduriformes. O relato do microscopista sobre a presença de leveduras pode ser um alerta para o diagnóstico do paciente.

Tendo em vista essas dificuldades, programas de capacitação para profissionais que atuam nessa atividade têm sido incentivados pelo Ministério da Saúde brasileiro. Entretanto são raros os trabalhos na literatura que abordam esse tipo de treinamento no caso das leishmanioses. Em outros agravos como a malária, são comuns programas de treinamento para os microscopistas, além de material de apoio para a prática laboratorial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009^a; NATEGHPOUR et al., 2012)

Na LV humana, a medula óssea (MO) constitui a amostra de eleição para pesquisa de formas amastigotas. Isso se deve ao fato da coleta no esterno ou na crista ilíaca ser considerada menos invasiva do que as punções hepatoesplênicas. Na LVC, empregam-se normalmente amostras de MO e linfonodo, obtidas também por punção. A pesquisa em amostras de baço e fígado, apesar de apresentam elevada sensibilidade, tem sido abandonada devido ao risco de hemorragias que podem ser fatais (SOLCA et al., 2014; ELMAHALLAWY et al., 2014; de RUITER, 2014).

A pesquisa parasitológica em MO pode ser realizada através de esfregaços preparados a partir de punções ou em "imprint" de biópsias de MO em lâminas de vidro. Estudos têm mostrado que os esfregaços apresentam maior quantidade de formas extracelulares de amastigotas em relação às biópsias. Formas extracelulares seriam mais fáceis de identificar devido ao pequeno tamanho do parasito e a necessidade de visualização das suas estruturas internas. Provavelmente, a origem das formas extracelulares está no momento do preparo dos esfregaços para o exame direto, e talvez isso explique a menor sensibilidade dos exames histopatológicos onde a maioria das formas permanecem dentro das células (CHOPRA et al., 2009; KUMAR et al., 2007).

Adicionalmente, a importância do exame de medula óssea no esclarecimento de febre de origem desconhecida tem sido demonstrada (CHANDRA et al., 2013; SHEIKH et al., 2003).

A especificidade dos exames diretos é de 100% e os valores de sensibilidade variam de 32,7% a 90,4%, reportado para LTA e de 52% a 85% para LV humana (GRIENSVEN & DIRO, 2012; WEIGLE et al., 1987; RAMIREZ et al., 2000). Com relação a LVC, os dados dos exames diretos são escassos. Saridomichelakis et al., 2005, analisando amostras de linfonodo e MO encontrou sensibilidade variando de 7,8% a 94,7% de acordo com o status clínico e número de campos examinados na lâmina.

Os dados relacionados à sensibilidade dos exames diretos muitas vezes são conflitantes e variados (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). Isso pode ser devido a diferentes fatores, entre eles a carga parasitária, a espécie de *Leishmania* envolvida, o tempo de evolução da lesão, qualidade do material coletado, a escolha do melhor espécime clínico para pesquisa, o tipo de corante utilizado, o tempo e o número de campos microscópicos examinados e a experiência do profissional que realiza o exame (RAMIREZ et al., 2000; CASTILLO & ROJAS, 1997).

Dentre esses fatores, o número de campos microscópicos examinados é um dos que possuem maior influência na sensibilidade do exame (AL-JITAWI et al., 1995; BRUSTOLONI et al., 2007; da SILVA 2005). Da Silva et al. (2005), observaram que a sensibilidade aumenta de acordo com o tempo de exame da lâmina, alcançando quase 100% quando se gasta cerca de 40 minutos de observação.

O tempo despendido para leitura do exame direto é, de fato, uma das grandes desvantagens do método, tornando-o exaustivo. Técnicas de concentração do material clínico podem constituir alternativas para contornar esse inconveniente. A concentração do material pela técnica de citocentrifugação é utilizada em análises histológicas (MOJICA & CHEN, 2014) e se baseia na concentração de células em suspensão com a utilização de uma citocentrífuga que opera em baixa velocidade produzindo uma monocamada de células em uma área pré-definida da lâmina com diâmetro conhecido. Tal equipamento possui uma maneira gradual de aceleração e desaceleração, diferenciada das centrífugas normais (de ROBIER et al., 2014). Reações subsequentes de imunofluorescência e ELISA podem também ser associadas ao método, aumentando a sensibilidade (LANDRY et al., 2000, LANDRY et al., 2008). Soluções hemolisantes também podem ser adicionadas às suspensões celulares, para permitir melhor visualização do material centrifugado após coloração (KARCIOGLU et al., 2010; ANDREJEVIC-BLANT et al., 2006).

Estudos relatam que a concentração por citocentrifugação apresenta algumas vantagens, quando comparada com a técnica clássica por distensão em lâmina, principalmente na obtenção de resultados mais rápidos, melhor resolução das células, menor desgaste do profissional que realiza o exame, aumento da eficiência na identificação microscópica dos parasitos e maior reprodutibilidade dos resultados (SARAIVA-ROMANHOLO et al., 2003). É uma abordagem versátil, já que pode ser empregada em diferentes espécimes clínicos, de acordo com o objeto da investigação. Tem sido empregada para o diagnóstico de doenças como a malária, filariose (PETITHORY et al., 1997) e viroses (LANDRY et al., 2000; LANDRY et al., 2008), apresentando bons resultados quando comparada aos métodos clássicos por distensão em lâminas. Entretanto, o procedimento de enriquecimento celular aumenta os custos analíticos e requer processamento das lâminas em um curto período de tempo após a coleta (SARAIVA-ROMANHOLO et al., 2003). Adicionalmente, a escolha do veículo adequado para tratamento da amostra é uma etapa importante, pois este deve permitir a adequada dispersão das células e não interferir na coloração ou procedimentos posteriores (PETITHORY et al., 1997).

A gota espessa é também uma forma de concentração de material clínico. Foi descrita por Ross (1903) para o diagnóstico de malária e é utilizada com eficiência até hoje. O desafio de Ross foi driblar a opacidade causada pela presença de hemoglobina, em um esfregaço com múltiplas camadas de sangue, pela desmoglobinização, utilizando a força iônica de uma solução.

A técnica de gota espessa é realizada como o depósito de duas gotas de sangue periférico em uma área de 1-2cm² da lâmina, posterior desmoglobinização e coloração pelo método de Giemsa. Além do diagnóstico da malária, seu uso é consagrado no diagnóstico de parasitos sanguíneos como as tripanosomíases e filarioses. A gota espessa possibilita o exame de maior quantidade de sangue (cerca de 20 vezes mais), em uma área pequena para leitura, aumentando a possibilidade do encontro do agente infeccioso, e por isso estima-se que apresente sensibilidade em torno de 10-20 vezes maior que o esfregaço simples (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009^a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009^b; MEDEIROS et al., 2010, NORGAN et al., 2013).

Apesar de laborioso, assim como outros métodos diretos, a utilização da gota espessa persiste através de suas vantagens combinadas de custo, disponibilidade e sensibilidade (NORGAN et al., 2013). Uma das dificuldades geralmente relatadas diz respeito à pouca fixação do material na lâmina, já que se trata de um esfregaço não fixado. Aquecimento em bico de Bunsen, secagem da lâmina ao ar por 24 horas, uso de acetona e a realização de

arranhaduras na lâmina têm sido avaliados para minimizar a perda de material, tendo este último método apresentado os melhores resultados (NORGAN et al., 2013, PETITHORY et al., 1997).

Embora a gota espessa seja um método simples, a sua utilização com outros espécimes clínicos, como a medula óssea, é rara. Encontramos um único relato com amostras de pacientes humanos apresentando febre de origem desconhecida (SHEIKH et al., 2003).

Pelo exposto acima, observamos que tanto a LTA como a LV são doenças complexas em diversos aspectos e o diagnóstico deve considerar a aplicação de ferramentas laboratoriais adequadas que forneçam respostas rápidas, seguras e que sejam complementares aos dados clínicos e epidemiológicos.

Apesar dos exames diretos constituírem uma abordagem laboratorial importante para ambas as doenças, ainda são métodos pouco valorizados, principalmente pela baixa sensibilidade e pelo tempo despendido para a leitura das lâminas. Assim, alternativas que visem contornar essas desvantagens são válidas, tendo em vista o baixo custo, a facilidade de execução, e o fato de serem métodos de confirmação parasitológica.

2. OBJETIVOS

2.1.GERAL

Avaliar os exames parasitológicos diretos no diagnóstico das leishmanioses.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Auxiliar o treinamento dos profissionais de saúde através da produção de material informativo envolvendo aspectos morfológicos do parasito e outros microrganismos para utilização em programas de capacitação;
2. Avaliar a validade dos exames parasitológicos diretos para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana e canina em áreas de recente detecção de leishmaniose visceral no Rio de Janeiro;
3. Padronizar a técnica de citocentrifugação com raspados de lesão cutânea para o diagnóstico da LTA;
4. Avaliar a técnica da gota espessa e da citocentrifugação em amostras de medula óssea para confirmação parasitológica de cães sororeatores para leishmaniose;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DELINEAMENTO E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este estudo objetivou estudar a validade dos exames direto para o diagnóstico das leishmanioses através de: a) produzir material informativo envolvendo aspectos morfológicos do parasito; b) divulgar artigos científicos mostrando a utilidade desses exames na prática diagnóstica e, c) propor alternativas de amostras clínicas e formas de processamento desses exames. Aqui, avaliamos o desempenho de métodos para a concentração da amostra clínica como a citoentrifugação e a gota espessa, empregando raspados de lesão cutânea e aspirados de medula óssea. A população de estudo envolveu pacientes humanos com leishmaniose tegumentar americana (LTA) e visceral (LV) e cães sororeatores eutanasiados segundo recomendação do ministério da saúde para o controle da leishmaniose visceral.

3.2. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/Fiocruz) sob o protocolo nº 18478413800005262/646.984 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob o número de protocolo LW-54/13.

Os casos de leishmaniose estudados foram oriundos da demanda do Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClinVigileish/INI/Fiocruz) que realiza, na sua rotina, o diagnóstico das leishmanioses empregando diferentes ensaios.

3.3. PRODUÇÃO DE MATERIAL INFORMATIVO

A partir de lâminas confeccionadas para o exame direto da LTA (“imprint” e/ou escarificação) foram selecionadas estruturas (parasitos e outros microrganismos) para

elaboração de pranchas coloridas para apoio nas atividades de microscopia. Essas lâminas pertencem ao acervo do LapClinVigileish e foram selecionadas de pacientes com diagnóstico já definido. Durante a revisão das lâminas, selecionaram-se as estruturas de interesse as quais foram foto-documentadas.

O material foi fotografado utilizando objetiva de imersão, empregando o software Motic Image Plus 2.0 para captura, tratamento, edição e medição da imagem. Foram confeccionadas pranchas coloridas contendo imagens de formas amastigotas de *Leishmania* típicas e atípicas, estruturas fúngicas e bacterianas que pudessem causar confusão no exame direto da LTA.

3.4. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EMPREGADOS NO ESTUDO

3.4.1. Cultura

A cultura foi realizada com fragmentos de tecido: lesão cutânea no caso dos pacientes de LTA; baço, pele íntegra e linfonodo nos casos caninos. Cada fragmento, após a coleta, foi acondicionado em solução salina estéril contendo antibióticos (penicilina e estreptomicina) e antifúngico (fluorocitosina) em concentrações previamente estabelecidas (DE MELLO et al., 2010). Após 24 horas nessa solução e a temperatura de 4°C, os fragmentos foram cortados e semeados separadamente em 3 tubos contendo meio de cultura bifásico NNN acrescido de meio Schneider's Insect Medium® suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

Amostras de medula óssea (MO) coletadas dos cães também foram processadas para cultura. Nesse caso, as amostras foram recebidas em tubo contendo EDTA e cerca de 150µL foram semeados no mesmo dia em que foi realizada a coleta, em tubos de cultura como mencionado acima.

A realização das biópsias foi de responsabilidade do médico ou médico veterinário. Os tubos contendo as amostras foram colocados em estufa BOD sob temperatura de 26-28°C e os exames foram realizados a fresco semanalmente durante 30 dias.

Nos casos onde houve isolamento de formas promastigotas, procedeu-se à produção de massa parasitária para posterior identificação etiológica. Essa etapa foi feita através de eletroforese de isoenzimas (multilocus enzyme electrophoresis - MLEE) de acordo com protocolos já definidos na literatura (CUPOLILLO et al., 1994). Empregamos cinco sistemas enzimáticos: enzima málica (ME), nucleosidase (NH), glicose-6-fosfato desidrogenase

(G6PDH), glicose fosfato isomerase (GPI) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH). Amostras de referência foram utilizadas em todos os ensaios.

3.4.2. Exames direto

3.4.2.1. Esfregaço de medula óssea

Foram confeccionados esfregaços com amostras de MO coletadas de casos humanos e caninos no mesmo dia que foi realizada a coleta, utilizando cerca de 1 μ L de amostra para preparação de um esfregaço delgado que permitisse a adequada visualização das células.

3.4.2.2. Raspados de lesão cutânea

Este procedimento foi realizado em ambiente ambulatorial, por profissional treinado. Inicialmente fez-se anti-sepsia com álcool etílico a 70% na lesão. A escarificação foi realizada na área mais infiltrada da borda da lesão utilizando-se lâmina de bisturi de ponta fina. O material obtido foi distendido na lâmina de vidro com áreas demarcadas, realizando-se pequenos esfregaços sem sobreposição. Através da utilização de uma lâmina de vidro com áreas demarcadas (6 demarcações de 6 mm² cada uma) foi possível realizar a quantificação de formas amastigotas, utilizando objetiva de imersão e rastreando todos os campos microscópicos de cada área da lâmina.

Parte do material coletado através dos raspados também foi acondicionado em tubos tipo eppendorf para realização da técnica de citocentrifugação.

3.4.2.3. Concentração por citocentrifugação

Essa técnica foi realizada com raspados de lesão e com amostras de medula óssea coletada dos casos caninos no mesmo dia em que foi realizada a coleta.

Para a padronização da técnica, foram testadas diversas soluções para veículo, para que não houvesse prejuízo nas estruturas celulares e da coloração. Foram testadas as seguintes soluções: cloreto de amônio (0,87%); ácido acético (2%); saponina (0,4%), álcool (70%) e formalina (2% e 10%) e os tempos de 5, 10 e 20 minutos de para avaliação do processo de hemólise.

Os raspados foram coletados em tubo tipo eppendorf contendo 50 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) e tratados com 150µL das soluções descritas acima. Nas amostras de MO foram testadas as quantidades de 5, 10 e 20µL de MO, utilizando as mesmas soluções sempre completando para o volume final de 200µL.

Para realização do diagnóstico, os raspados foram coletados na borda interna das lesões cutâneas ulceradas, com auxílio de lâmina de bisturi, sendo o material colocado imediatamente em tubos tipo eppendorf contendo 50 µL de solução salina estéril (NaCl 0,9%) que foi tratado com 150µL de cloreto de amônio (0,87%) durante 5 minutos para obtenção de hemólise. As amostras de MO foram coletadas em EDTA e processadas no mesmo dia da coleta. Foram utilizados 5µL de MO e 195µL de cloreto de amônio (0,87%) durante 5 minutos. O tempo para obtenção de hemólise foi controlado rigidamente a fim de impedir danos nas outras células.

Utilizamos a citocentrífuga Hettich (Modelo rotofix 32A) e a centrifugação foi realizada a 2500 rpm durante 10 minutos com amostras de raspados e MO, sendo o material depositado em uma área com cerca de 6mm² em lâmina de microscopia de vidro.

Após a citocentrifugação, as lâminas foram fixadas empregando metanol e coradas pelo Giemsa. A leitura foi realizada em microscópio ótico, em objetiva de imersão avaliando a presença de formas amastigotas, a dispersão e morfologia das células e a obtenção de hemólise.

3.4.2.4. Gota espessa

A técnica de gota espessa foi realizada com amostras de MO coletadas com EDTA dos casos caninos. A quantidade de 5µL foi distendida em uma área de 1 cm² da lâmina, com auxílio de um cartão com área demarcada, e deixadas secar a temperatura ambiente.

Nota: As preparações de gota espessa não foram submetidas a fixação

As lâminas de citocentrifugação, esfregaços e raspados de lesão cutânea foram fixadas em metanol e posteriormente coradas pelo método de Giemsa. A coloração foi realizada através da diluição do corante em água tamponada e imersão das lâminas durante 20 minutos na solução. Para a gota espessa a etapa de desmoglobinização foi associada etapa de coloração que se seguiu como descrito acima.

A leitura foi feita com objetiva de imersão (x1000) examinando-se todos os campos das áreas demarcadas da lâmina. Para os esfregaços, considerou-se a leitura de cerca de 1000-1500 campos.

3.5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram avaliadas a validade dos raspados de lesão cutânea, citocentrifugação, esfregaço e da gota espessa processadas com diferentes espécimes clínicos para o diagnóstico, comparando-se com a cultura.

Foi realizada a análise exploratória dos dados através de frequências e medidas de tendência central e dispersão de variáveis contínuas. O teste de qui-quadrado de Pearson foi empregado na avaliação de associação entre duas variáveis qualitativas. Entretanto, no caso de tabelas formadas por 2 linhas e 2 colunas, foi empregado um teste alternativo denominado teste Exato de Fisher. Na validação das técnicas diagnósticas, a comparação entre técnicas foi realizada pela análise dos valores de sensibilidade e especificidade. As análises estatísticas foram realizadas com o software SPSS 16.0.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo serão apresentados a partir de seis artigos científicos publicados ou em fase de publicação.

Os artigos estão ordenados da seguinte forma:

- Artigo 1: Apresenta a produção material informativo contendo fotomicrografias de formas amastigotas de *Leishmania* sp. e de outros microrganismos que podem fazer confusão no exame direto. A proposta é que esse material seja utilizado em programas de capacitação profissional
- Artigo 2: Constitui um artigo de opinião acerca dos custos dos exames diretos da LTA.
- Artigo 3: Relata um caso autóctone de leishmaniose visceral em uma criança no município de Volta Redonda no estado do Rio de Janeiro.
- Artigo 4: Relata uma série de nove casos autóctones de leishmaniose visceral humana no município de Barra Mansa no estado do Rio de Janeiro.
- Artigo 5: Relata um surto de leishmaniose visceral canina no município de Barra Mansa no estado do Rio de Janeiro, apresentando dados parasitológicos dos cães eutanasiados.
- Artigo 6: Descreve a utilização dos exames direto como a gota espessa e a citocentrifugação empregando amostras de medula óssea na confirmação parasitológica de leishmaniose em cães sororeatores
- Além dos artigos, apresentamos os resultados preliminares da utilização da citocentrifugação com raspados de lesão.

4.1. ARTIGO 1

Tegumentary Leishmaniasis: A Diagnostic Approach Considering Aspects of the Cytological Examination

Artigo publicado na revista Acta Cytologica

DOI: 10.1159/000363121

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar (LTA) nem sempre é uma tarefa fácil devido ao espectro de manifestações da doença. Os exames parasitológicos são importantes, sobretudo o exame direto, que são testes de fácil execução e baixo custo. Entretanto, por se tratar de um exame subjetivo torna-se imprescindível a capacitação e treinamento dos profissionais que realizam esse exame, para que formas amastigotas não sejam confundidas com outras estruturas presentes nas preparações. Nas leishmanioses não existe material ilustrativo que possa ser utilizado nas atividades de capacitação, como já existe para outros agravos, como por exemplo, a malária. Sabendo da importância desse tipo de material na rotina laboratorial, tivemos como objetivo elaborar pranchas coloridas contendo fotomicrografias para auxílio durante as leituras microscópicas.

Foi realizada revisão no acervo de lâminas confeccionadas para o exame direto da LTA (“imprint” e escarificação) de pacientes atendido no ambulatório do LapClinVigileish/INI/Fiocruz. Nas lâminas, foram selecionadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. que apresentavam morfologia típica e atípica; estruturas fúngicas e bacterianas presentes nas preparações passíveis de confusão no diagnóstico da LTA. As fotomicrografias foram realizadas empregando o software Motic Image Plus 2.0. Após captura, edição, medição e seleção das imagens, foram construídas duas pranchas medindo 13 x 17cm contendo as principais imagens. Tal material visa não só contribuir para os programas de capacitação, mas também, sensibilizar os gestores para a necessidade da inclusão desse tipo de material nos manuais de controle.

Esse artigo responde integralmente ao objetivo nº 1 desta tese

Tegumentary Leishmaniasis: A Diagnostic Approach Considering Aspects of the Cytological Examination

Cintia Xavier de Mello Luan Hugolino de Morais Armando de Oliveira Schubach
Fátima Madeira

Laboratory of Leishmaniasis Surveillance, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Key Words

Direct examination · Tegumentary leishmaniasis ·
Optical microscopy

Abstract

Objective: To elaborate figures that highlight the microscopic appearance of amastigote forms of the genus *Leishmania* and other structures subject to confusion during the routine of the direct examination of tegumentary leishmaniasis (TL). **Study Design:** We reviewed imprint and scraping slides previously prepared from patients with a definite diagnosis. Smear examinations were performed with an immersion objective ($\times 1,000$) selecting structures of interest for photodocumentation and elaboration of the illustrations. **Results:** We elaborated two 13×17 cm figures containing photomicrographs of amastigote forms with typical and atypical morphology of *Leishmania* parasites and other microorganisms, mainly fungi in the yeast-like phase and bacteria which could be confused with amastigote forms during the direct examination. **Conclusions:** The production of material like we show here is important and should be encouraged because of the need for constant training of professionals working in the area of TL diagnosis.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

Tegumentary leishmaniasis (TL) is an infectious disease which is neglected worldwide and its diagnosis is complex [1]. Despite the implementation of innovative methodologies in recent years, direct parasitological examination remains the first option for diagnosis, mainly because this is a simple method that can be deployed and provided easily at primary levels of health [2–4]. Nevertheless, the finding of amastigote forms of *Leishmania* sp. is not always an easy task, due to the possibility of confusing them with other microorganisms or even the numerous artifacts present in smear preparations which can lead to possible misdiagnosis [5].

Differential diagnosis should consider bacterial infections, leprosy, tuberculosis, syphilis, eczema, tumors, paracoccidioidomycosis, sporotrichosis, histoplasmosis and sarcoidosis among others [6, 7]. In several regions of Brazil, the diagnosis is often based on the clinical presentation of lesions and on the Montenegro skin test [8]. Neither of these approaches has a definitive diagnostic character; direct examination represents a safe tool for diagnosis and can resolve some of the cases [9].

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/acy

© 2014 S. Karger AG, Basel
0001-5547/14/0000-0000\$39.50/0

Correspondence to: Dr. Cintia Xavier de Mello
Laboratory of Leishmaniasis Surveillance, Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ
Avenida Brasil, 4365 Manguinhos
Rio de Janeiro 21040-900 (Brazil)
E-Mail cintia.mello@ipecc.fiocruz.br

Although direct examination is considered a method of low complexity, it requires skilled and trained human resources because it is a subjective method which is influenced by the experience of the professional. Structures which present any similarity to amastigote forms, either in morphology or coloration, can lead to mistaken analysis by a less-experienced microscopist [5]. Recently, our group described a case of disseminated sporotrichosis in which a slide prepared for direct examination showed numerous rounded and ellipsoid structures located inside and outside macrophages, similar to the amastigote forms of *Leishmania*, alerting to a possible misdiagnosis [5].

In this context, through the experience accumulated during the training of professionals who perform this activity, we realized the importance of the elaboration and dissemination of information and material that highlight the microscopic appearance of *Leishmania* parasites and other microorganisms subject to TL misdiagnosis.

Materials and Methods

Imprint and scraping slides were selected for revision. These were obtained from patients with a known final diagnosis who had attended the Leishmaniasis Surveillance Ambulatory Service (Vigileish/IPEC/Fiocruz) from 2009 to 2011. These patients agreed to participate by signing a free and informed consent form. The slides were stained with Giemsa dye and the reading was performed with an immersion objective ($\times 1,000$) selecting structures of interest for photodocumentation, such as typical and atypical amastigote forms as well as fungal and bacterial structures. Photomicrographs were prepared using the Motic Images Plus 2.0 software. Images were captured, edited, measured and selected, and 13×17 cm figures were then compiled.

Results

Initially, we selected slides showing typical forms of amastigotes, i.e. all structures showing oblong shapes with an intact and well-defined cell membrane, a pinkish-purplish cytoplasm, a nucleus located at one end of the parasite and the presence of a kinetoplast that was rounded or rod-shaped, juxtaposed, smaller and slightly darker than the nucleus. It is also possible to observe the size of amastigotes (approx. $2 \times 4 \mu\text{m}$) when compared to the size of erythrocytes (approx. $7 \mu\text{m}$; fig. 1a) [10]. In addition, we selected atypical amastigote forms that perhaps could raise doubts as to the diagnosis, mainly because the kinetoplast could not be visualized (fig. 1b).

We selected slides that showed the presence of fungal and bacterial structures, which are common in samples

collected from ulcerated skin lesions (fig. 2) [11]. Fungal structures are ellipsoidal, with sizes ranging from 2 to $5 \mu\text{m}$ in diameter, and they present nuclei which stain purple with Giemsa. It is worth noting that, although resembling amastigotes, fungal structures do not present a kinetoplast and they have a halo around them which represents the negative image of the fungal cell wall which is not stained by Giemsa. Sprouting can sometimes be visualized on the surface of the parent cell, which facilitates the differentiation from yeast forms. Bacteria can be visualized as small spherical cells (cocci), which also stain purple with Giemsa. Despite not being mistaken for the amastigotes of *Leishmania* sp., when in abundance, these can be inconvenient for cytological examination because they pollute the microscopic field and hamper the visualization of the parasite.

Another aspect that should be emphasized concerns the finding of yeasts on direct examination of skin lesions, the characteristics of which may lead to a possible misdiagnosis, such as sporotrichosis. *Sporothrix schenckii* yeasts measure $3\text{--}5 \mu\text{m}$ [12] and are very similar to amastigote forms. Figure 2c shows how these yeasts can be found on cytological examination.

Discussion

Definitive diagnosis of TL relies on the visualization of amastigotes, and, to this end, direct examination is a very useful tool [1]. However, in a smear exam, the presence of other microorganisms and/or artifacts may occur and this can lead to misdiagnosis [13]. Considering that direct examination is often subjective, it is important to conduct regular qualification and training programs for professionals who perform this activity. Our laboratory routinely conducts professional training programs in various regions of Brazil. Besides the correct morphological identification of amastigotes, the differentiation between these and other forms is reported as one of the main difficulties of this activity. In the case of TL, a false-positive result may lead to unnecessary exposure of patients to the adverse effects of drugs or the neglect of other dermatological disorders by medical professionals [14].

TL diagnosis is complex and the incorporation of activities aimed at maintaining the competence of microscopists in control programs is essential [15]. The production of didactic material like this study should be made available in the support of microscopic practice. In other diseases, e.g. malaria, such material is quite common [16, 17]. However, in leishmaniasis, we note

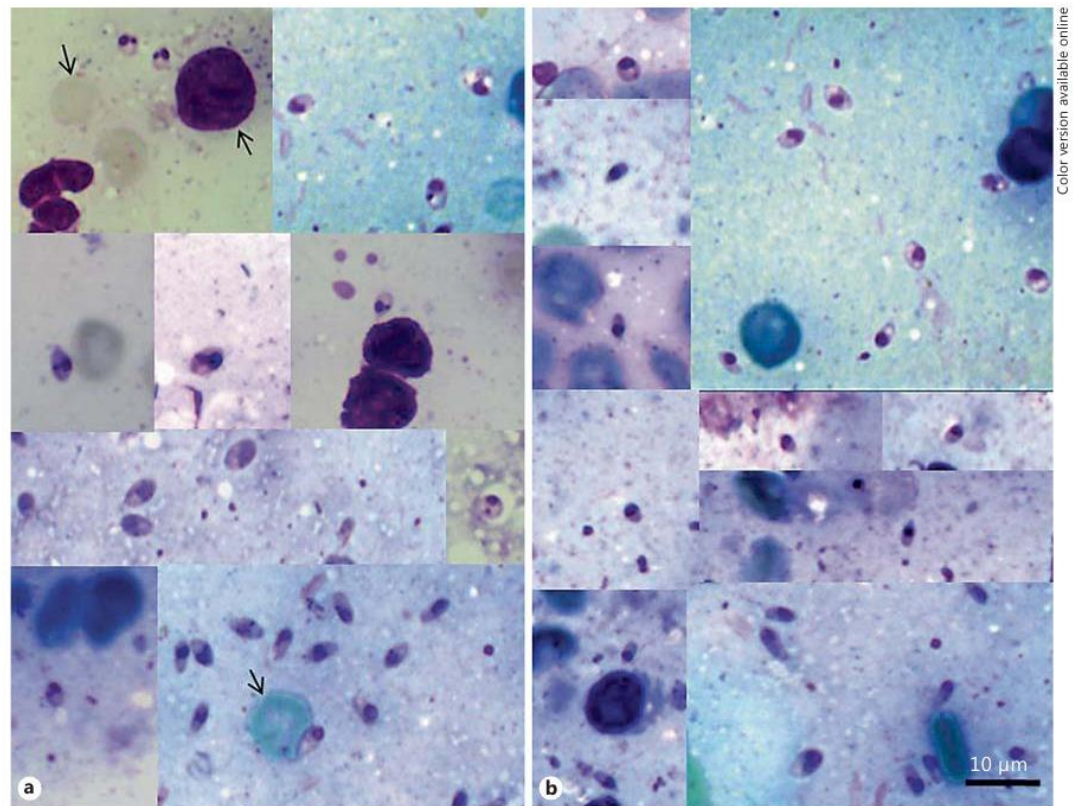


Fig. 1. Typical (a) and atypical (b) amastigote forms of *Leishmania* sp. visible on slides from patients with a confirmed diagnosis of TL. **a** The presence of a kinetoplast can be identified in all the structures selected. The amastigote form can be visualized among other cells present in the microscopic field (arrow). **b** The kinetoplast cannot be identified in most of the images selected. Giemsa stain. $\times 1,000$.

that there is a total lack of didactic material focused on laboratory activities. In this study, we aimed to fill this gap by producing figures that could aid professionals in the reading of microscopic slides for the diagnosis of TL.

Although it would be difficult for the field worker to pick up these photomicrographs, the images produced in this study may raise awareness among managers of the importance of this type of material in publications by the Brazilian Ministry of Health. This material is already being used in training courses offered by our laboratory and it has been well received. Material similar to this already exists for the clinical and differential diagnosis of TL [18] and for the laboratory diagnosis of malaria [17]. This initiative might be a differentiator for training programs and refresher courses, constituting one more tool to aid in this process. Furthermore, it meets the recommendations of

the World Health Organization regarding the use of didactic material in support of laboratory practice [19].

Amastigote forms of *Leishmania* sp. measure $2 \times 4 \mu\text{m}$ and can be found inside or outside macrophages. These forms exhibit cellular structures, such as the kinetoplast; this aids in distinguishing them from artifacts or other microorganisms present on the slides. It is very common to use images of macrophages filled with amastigotes in training activities, but microscopists do not encounter them in their daily routine because most forms are rare and are found free on the slide (fig. 1a). In cases of infection caused by some *Leishmania* species (e.g. *Leishmania amazonensis*), it is common to find numerous amastigote forms on direct examination. Although the case shown in figure 1 is caused by *L. braziliensis*, the parasite richness observed here is a rare event. In some cases, it is not possible to visualize structures like the parasite kinetoplast

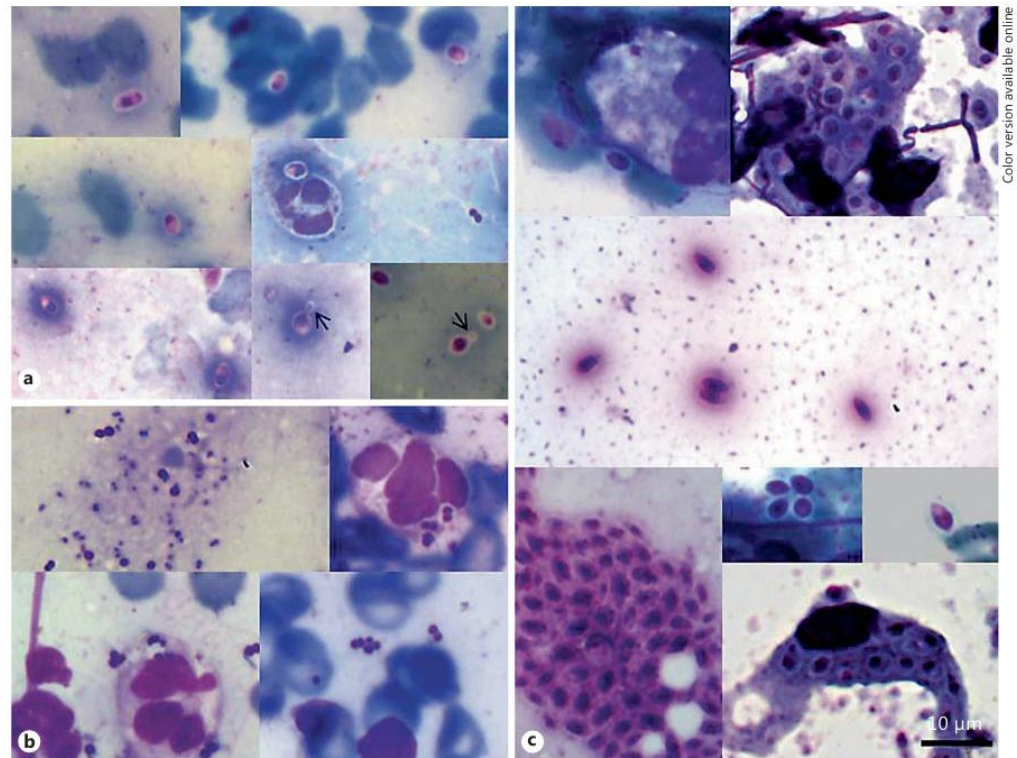


Fig. 2. Yeasts (a), bacteria (coccus and diplococcus; b) and the yeast-like phase of *S. schenckii* (c). Yeasts present in the material may be mistaken for amastigotes, and bacteria pollute the microscopic field, hampering the slide reading. The arrows indicate sprouting on the surface of the parent cell, characterizing yeast forms. Giemsa stain. $\times 1,000$.

(fig. 1b); this usually depends on how the amastigote form was placed during the preparation of the slide or it may be related to the poor differentiation of these structures during staining. We would like to note that the finding of these forms, although perhaps not sufficient to ensure a positive result, is important to alert the professional of the need for a more detailed examination of the slide or even for requesting a new sample.

Fungal elements in the yeast-like phase are structures commonly found on smear examination. It is already known that the yeast of *Histoplasma capsulatum* can be confused with amastigote forms if stained by Giemsa [20]. *H. capsulatum* presenting as yeast cells, oval in shape and 1–4 μm in diameter, can be observed in macrophages and neutrophilic granulocytes with a refractive edge simulating a capsule [21]. However, the kinetoplast, a structure which is decisive in the identi-

fication of *Leishmania* amastigotes, cannot be viewed in this microorganism.

The finding of *S. schenckii* yeast on direct examination is a rare event [22], usually occurring in cases of disseminated sporotrichosis in immunocompromised patients [5, 23]. Such structures could be visualized in a case of sporotrichosis selected for this study (fig. 2c). This can serve as a warning sign for professionals involved in the direct examination of TL, especially in areas where it overlaps with sporotrichosis, like in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. In addition, coinfection with *Leishmania* and *S. schenckii* should also be considered [24].

It is worth noting that, although resembling amastigotes, fungal structures do not present a kinetoplast, and a halo around them can be observed which represents the negative image of the fungal cell wall; this is not stained by Giemsa. These aspects are equally important in the di-

rect examination; they are easily verified in figure 2a. Secondary bacterial infections are relatively frequent in TL lesions [11, 25] and may prevent diagnosis by culture. In these situations, direct examination may enable final diagnosis of TL, but the presence of the bacteria on the slide can also be a drawback because they disturb the reading by polluting the microscopic field, thus hampering the visualization of amastigote forms (fig. 2b).

Training qualified personnel plays a critical role in the context of the laboratory diagnosis of TL. Implementing and maintaining such programs is a difficult task, considering the diversity found in Brazilian endemic areas, but these programs are urgently required [26]. The morphological characteristics of parasites that present on direct

examination preparations are essential for case completion. We trust that the material elaborated in this study will be useful in qualification and training activities programs for professionals who perform this activity.

Acknowledgements

Funding was received from the National Counsel of Technological and Scientific Development, the Institutional Program for Scientific Initiation Scholarships and the Foundation for Research Support of the State of Rio de Janeiro/Research Assistance Program (APQ1; Process No. 110.403/2012). F. Madeira and A.O. Schubach hold a grant from CNPq for their productivity in the research.

References

- World Health Organization: Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 949. Geneva, WHO, 2010.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S: Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:581–596.
- Rosenblatt JE: Laboratory diagnosis of infections due to blood and tissue parasites. *Clin Infect Dis* 2009;49:1103–1108.
- Durdu M, Baba M, Seçkin D: More experiences with the Tzanck smear test: cytologic findings in cutaneous granulomatous disorders. *J Am Acad Dermatol* 2009;61:441–450.
- de 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;44:127.
- Markle WH, Makhoul K: Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am Fam Physician* 2004;69:1455–1460.
- Ministério da Saúde: Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar Americana. Brasília, Ministério da Saúde, 2010.
- de Lima 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;93:41–47.
- de Mello CX, Schubach AO, de Oliveira RV, Conceição-Silva F, Pimentel MI, Lyra MR, E Vasconcelos EC, de Fátima Madeira M: 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. *Parasitol Res* 2011;109:927–933.
- Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W: Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des* 2002;8:297–318.
- Ziaie H, Sadeghian G: Isolation of bacteria causing secondary bacterial infection in the lesions of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol* 2008;53:129–131.
- Cagnini DQ, Rodrigues MMP, Palumbo MIP, Heckler MCT, Peixoto AS, Amorim RL, Machado LHA: Diagnóstico citológico e tratamento da esporotricose felina: relato de caso. *Vet e Zootec* 2012;19:186–191.
- Daneshbod Y, Dehghani SJ, Daneshbod K: Bone marrow aspiration findings in kala-azar. *Acta Cytol* 2010;54:12–24.
- Kahama-Maró J, D'Acremont V, Mtsiwa D, Genton B, Lengeler C: Low quality of routine microscopy for malaria at different levels of the health system in Dar es Salaam. *Malar J* 2011;10:332.
- Nateghpour M, Edrissian G, Raeisi A, Motevalli-Haghi A, Farivar L, Mohseni G, Rahimi-Froushani A: The role of malaria microscopy training and refresher training courses in malaria control program in Iran during 2001–2011. *Iranian J Parasitol* 2012;7:104–109.
- World Health Organization: Malaria Microscopy Quality Assurance Manual – version 1. Geneva, WHO, 2008.
- Ministério da Saúde: Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília, Ministério da Saúde, 2009.
- Ministério da Saúde: Atlas de leishmaniose tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília, Ministério da Saúde, 2006.
- World Health Organization: Informal consultation on quality control of malaria microscopy. Geneva, WHO, 2006.
- São Thiago PT, dos Santos JI, Steindel M: Histoplasmosis at the oral cavity simulating mucocutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31:225–229.
- Bonifaz A, Vázquez-González D, Perusquia-Ortiz AM: Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2011;9:705–714.
- Morris-Jones R: Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol* 2002;27:427–431.
- Pang KR, Wu JJ, Huang DB, Tying SK: Subcutaneous fungal infections. *Dermatol Ther* 2004;17:523–531.
- Agudelo SP, Restrepo S, Velez ID: Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. *J Am Acad Dermatol* 1999;40:1002–1004.
- Fontes CO, Carvalho MA, Nicoli JR, Hamdan JS, Mayrink W, Genaro O, Carmo LS, Farias LM: Identification and antimicrobial susceptibility of micro-organisms recovered from cutaneous lesions of human American tegumentary leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. *J Med Microbiol* 2005;54:1071–1076.
- Luz ZM, Carneiro M, Schall V, Rabello A: The organization of health services and visceral leishmaniasis: an integrated intervention to improve diagnosis and treatment. *Cad Saude Publica* 2009;25:1177–1184.

4.2. ARTIGO 2

Skin scraping is the most accessible technique for the parasitological diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis

Artigo submetido a publicação na revista *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*

Este artigo foi elaborado no formato de carta para a seção de “Letter to the editor” relacionado à publicação do artigo intitulado “Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*”.

Os exames diretos são normalmente ferramentas negligenciadas devido principalmente à sua baixa sensibilidade. No artigo de Sousa et al. (2014), é apresentada uma alternativa para o exame direto denominada “press imprint smear”, na qual um fragmento de biopsia é comprimido entre duas lâminas de vidro e posteriormente fixado e corado. A sensibilidade do método ficou em torno de 85%. Segundo os autores, essa abordagem facilitaria a utilização dos exames diretos para o diagnóstico da LTA, já que constituiria uma abordagem mais barata que a escarificação e sua leitura poderia ser realizada após um curto período de treinamento para os técnicos responsáveis.

Em nossa carta, inicialmente parabenizamos os autores pela publicação e pela iniciativa do investimento na melhoria dos exames diretos. Embora os índices de sensibilidade mostrados no artigo tenham sido elevados, achamos prudente opinar no quesito “barato” apontado pelos autores.

Entre os pontos abordados em nossa carta, chamamos a atenção de que a coleta de um fragmento por biopsia constitui um procedimento médico e nas áreas carentes a figura desse profissional nem sempre está disponível. Esse fato impediria a coleta. Além disso, achamos importante mencionar que tal procedimento exigiria o emprego de soluções anestésicas, seringa agulhada e material para possível sutura, encarecendo assim o método descrito. Adicionalmente, discutimos a questão do treinamento dos profissionais baseado em nossa experiência.

Nossa carta objetivou ampliar a discussão no contexto envolvendo a facilidade de aplicação dos exames diretos nas áreas endêmicas.

Este artigo está relacionado ao objetivo geral desta tese.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene



Skin scraping is the most accessible technique for the parasitological diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Letter to the Editor
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Mello, Cintia; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses Madeira, Maria; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses
Key Words:	Leishmaniasis, Diagnosis, Diagnostics

SCHOLARONE™
Manuscripts

view

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

LRH: DE MELLO AND MADEIRA

RRH: SKIN SCRAPING IN THE DIAGNOSIS OF ATL

Skin scraping is the most accessible technique for the parasitological diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis

Cintia X. de Mello and Maria de Fátima Madeira

Laboratory of Leishmaniasis Surveillance – Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Rio de Janeiro/Brazil.

Abstract: Direct examination remains the first choice for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in endemic areas. New approaches have been considered to improve the performance of this examination. However, the skin-scraping smear continues to be the least expensive option. Although direct examination is considered a method of low complexity, skilled and trained human resources are needed to avoid a possible misdiagnosis.

Address correspondence to Cintia X. de Mello, Laboratory of Leishmaniasis Surveillance – Oswaldo Cruz Foundation/FIOCRUZ, Rio de Janeiro/Brazil.
E-mail: cintia.mello@ini.fiocruz.br.

Maria de Fatima Madeira hold a grant from National Counsel of Technological and Scientific Development - CNPq for your productivity in the research.

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

Dear sir,

We read with interest the article in the november 2014 issue of the journal by Sousa and others entitled: "Press Imprint Smear: A Rapid, Simple, and Cheap Method for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*". We agree about that the direct diagnosis by microscopic visualization of amastigote forms is the first choice for the diagnosis of leishmaniasis. These techniques gathers advantages like quickness, simple execution and low operational cost being adequate to use in poor endemic areas^{1,2}. The results obtained using a press imprint smear were very satisfactory, reaching a sensitivity of approximately 85%, while the best results for the direct tests for leishmaniasis diagnosis have presented sensitivity values around 60-70%^{3,4}.

These authors state that their method is cheaper than skin scraping: "skin scraping (...) A scalpel or a curette is required for the procedure. With Press-Imprint-Smear, only a punch is needed, and the procedure is simpler and less expensive." The authors did not consider the necessity of using anesthetic drugs, a minimally structured outpatient setting, and sterile equipment in biopsy procedures. Moreover, one must consider the potential need for suturing material. Additionally, procedures involving anesthesia and suture are only performed by medical professionals, and this is the biggest drawback to the method in endemic settings. All of these aspects increase the cost of examination, making it undoubtedly more expensive than skin scraping. In addition, skin scraping may be performed by a well-trained technician, facilitating the use of this procedure in areas with poor infrastructure.

In relation to slide interpretation, the authors say that "A technician can learn to identify amastigotes with a short training course." In fact, although direct examination is considered a method of low complexity, the finding of amastigote forms of *Leishmania* sp. is not always an easy task. The possibility of the presence of other microorganisms in the

1
2
3 lesion, such as *Sporothrix schenckii* and *Histoplasma capsulatum*, besides artifacts, highlights
4
5 the need for skilled and trained human resources to avoid a possible misdiagnosis, because it
6
7 is a subjective method that is influenced by the experience of the professional^{5,6,7}.
8

9
10 We have conducted training courses in some Brazilian regions, and realized the
11
12 importance of programs for training professionals who conduct direct examination for
13
14 leishmaniasis, and the challenges in continuing these activities. Thus, besides constant
15
16 training, it is equally important to produce and disseminate informational materials, such as
17
18 photomicrographs with amastigotes forms and other microorganisms to help the professionals
19
20 who perform this activity, similar to what already exists for other health problems, such as
21
22 malaria^{8,9}.
23
24

25 We are pleased to note that other groups have been dedicated to this idea, and have
26
27 worked to improve direct examination, which is the tool of choice, to safely address a large
28
29 number of leishmaniasis cases in endemic areas.
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

REFERENCES

1. World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. WHO technical report series; no. 949
2. Brito MMC, Tarquinio DC, Arruda D, Costa RS, Roselino AM, 2009. Tzanck smears: an old but useful diagnostic tool. *An Bras Dermatol* 84: 431-433.
3. de Mello CX, de Oliveira Schubach A, de Oliveira RV, Conceição-Silva F, Pimentel MI, Lyra MR, E Vasconcellos EC, de Fátima Madeira M, 2012. 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. *Parasitol Res* 109: 927-933.
4. ul Bari A, Azam S, Ejaz A, Mahmood T, 2010. Comparison of various cytodagnostic tests in the rapid diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists* 20: 63-69.
5. de Mello CX, Schubach AO, Madeira MF, 2011. Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis? *Rev Soc Bras Med Trop* 44: 127.
6. São Thiago PT, Santos JI, Steindel M, 1998. Histoplasmose em região de palato duro simulando lesão causada por *Leishmania*. *Rev Soc Bras Med Trop* 31: 225-229.
7. Brustoloni YM, Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, Pontes ER, Oliveira AL, Hillebrand L, Ribeiro LF, 2007. Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of the Center-West Region of Brazil. *Braz J Infect Dis* 11: 106-109.
8. de Mello CX, de Moraes LH, Schubach Ade O, Madeira F, 2014. Tegumentary leishmaniasis: a diagnostic approach considering aspects of the cytological examination. *Acta Cytol* 58: 383-387.
9. Ministério da Saúde, 2009. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Ministério da Saúde.

4.3.ARTIGO 3

Expansion of visceral leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil: report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis

Artigo publicado na Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 56(3):271-274, May-June, 2014

A leishmaniose visceral (LV) continua a ser um importante problema de saúde pública em todo o mundo. No Brasil, tem sido observada uma expansão acentuada da doença nas últimas décadas, particularmente nas regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste do país. Segundo o Manual de Controle da LV, o estado do Rio de Janeiro é classificado como uma área onde casos de LV ocorrem de forma esporádica. De fato, tem sido assim, desde o surto ocorrido na década de 70. Entretanto, nos últimos anos a ocorrência de casos humanos em áreas onde anteriormente não se tinha registro da doença tem causado preocupação. Este artigo relata um caso autóctone de LV em uma criança na cidade de Volta Redonda – RJ. A criança de cinco anos foi hospitalizada com quadro de febre prolongada e aumento de abdômen. A suspeita de LV foi levantada somente após a segunda internação e o diagnóstico foi confirmado facilmente através do exame direto realizado com amostra de medula óssea. Esse trabalho relatou o primeiro caso de LV humana em Volta Redonda e representou um alerta para clínicos e pediatras dessa região, que passaram a incluir a investigação de LV em todo paciente com febre prolongada.

Esse artigo responde parcialmente ao objetivo nº 2 desta tese.

CASE REPORT

EXPANSION OF VISCERAL LEISHMANIASIS IN THE STATE OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL: REPORT OF THE FIRST AUTOCHTHONOUS CASE IN THE MUNICIPALITY OF VOLTA REDONDA AND THE DIFFICULTY OF DIAGNOSIS

Luiz Henrique Conde SANGENIS(1,2), Sebastião Roberto de Almeida LIMA(3), Cíntia Xavier de MELLO(4), Daniela Trindade CARDOSO(3), Jurema Nunes MELLO(1), Maria Cristina Carvalho do ESPÍRITO SANTO(1) & Walter TAVARES(1)

SUMMARY

Visceral Leishmaniasis has been showing remarkable epidemiological changes in recent decades, with marked expansion and an emergence of cases in urban areas of the North, Southeast and Midwest regions of Brazil. The Kala-azar cases reported here, despite being very characteristic, presented a great difficulty of diagnosis, because the disease is not endemic in Volta Redonda. The child underwent two hospitalizations in different hospitals, but got the correct diagnosis only after 11 months of symptom onset. In this report we discuss the main differential diagnoses and call attention to the suspected symptoms of visceral leishmaniasis in patients with prolonged fever, hepatosplenomegaly and pancytopenia, even in areas not traditionally endemic for the disease.

KEYWORDS: Visceral Leishmaniasis; Kala-azar; Epidemiology; Rio de Janeiro.

INTRODUCTION

Visceral Leishmaniasis (VL) remains an important public health problem worldwide with an estimated annual incidence of 500,000 cases and 50,000 deaths¹⁶. In Brazil, a marked expansion of the disease in the last decades has been observed, particularly in the North, Southeast and Midwest country regions^{4,5,7}. In the state of Rio de Janeiro (RJ), the occurrence of human cases is sporadic, with most reports concentrated in the city of Rio de Janeiro, relating to conditions of poverty and deforestation of protected areas⁷. The city of Volta Redonda is located in the Médio Paraíba area, South Fluminense region and 120 km from the capital. It has 260,000 inhabitants. The steel industry and the service sector are the most important economic activities, creating migration flows that contribute to uncontrolled growth and occupation of previous rural areas around the urban center¹³.

The objective of this report is to draw the attention of clinicians and pediatricians and ensure they always include the diagnosis of VL in every patient with prolonged fever and hepatosplenomegaly.

CASE REPORT

LGD, 5 years old, white, male, born in Volta Redonda, resident in Jardim Belmonte. In September 2011 he was admitted to the pediatric

ward of the Municipal Hospital São João Batista (MHSJB) with a reported fever and enlarged abdomen that he had had for 15 days, associated with cough, weight loss and poor general condition. His previous medical records showed earlier hospitalization, from November 2010 to January 2011 at another hospital in the municipality with the same symptoms. At his first hospital admission, the patient developed neutropenia and sepsis and was transferred to the intensive care unit (ICU). Initially, the following possible diagnoses were investigated: leukemia, lymphoma, AIDS, tuberculosis, hepatitis, toxoplasmosis, cytomegalovirus infection, infectious mononucleosis, typhoid fever and the juvenile form of paracoccidioidomycosis. Various antimicrobial agents were used, including amphotericin B deoxycholate for 15 days. According to the medical records, the final hypothesis at the patient's discharge was cat-scratch disease. All tests were initially negative (specific serology, tuberculin test, microscopy of gastric contents for AFB, fecal culture, bone marrow microscopy, cervical lymph node biopsy). The hypothesis of VL came to be considered, although no confirmatory test was requested at the time. In epidemiological history, the child's mother denied a history of travel outside the RJ.

The physical examination at admission in the pediatric ward of MHSJB showed that patient had lost 14 kg weight, had pallor, dehydration, presence of lymphadenopathy in small chains of cervical area and massive hepatosplenomegaly (Fig. 1). The diagnosis of leukemia and sepsis were

(1) Discipline of Infectious and Parasitic Diseases, School of Medicine at the University Center of Volta Redonda, State of Rio de Janeiro, Brazil. E-mails: j.nunesmello@globo.com, cristinaespiritosanto@uol.com.br, tavareswalter14@gmail.com

(2) Clinical Research Laboratory in Chagas Disease, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, State of Rio de Janeiro, Brazil.

(3) Discipline of Pediatrics, School of Medicine at the University Center of Volta Redonda, State of Rio de Janeiro, Brazil. E-mails: sebastiaoirlima@globo.com, dtrindadecardoso@bol.com.br

(4) Laboratory for Leishmaniasis Surveillance, Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation, State of Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: cintia.mello@ipecc.fiocruz.br

Correspondence to: Luiz Henrique Conde Sengenis, Laboratório de Pesquisa Clínica em doença de Chagas/IPEC/FIOCRUZ. Av. Brasil, 4365, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel: 55 21 3865-9648. E-mail: lhcsengenis@gmail.com

initially suspected and intravenous hydration and cefepime was started, new laboratory tests and the hematology department were called. The initial blood count showed 3.64 million erythrocytes, hemoglobin 7.3 g%, hematocrit 25.5%, total leukocyte count 3,800, with 14% neutrophils and platelets 93,000. Total protein 6.7g/dL, 2.2g and 4.5g albumin and globulin levels respectively. Serology for HIV, syphilis, hepatitis, toxoplasmosis and cytomegalovirus were negative. The chest radiography was normal. The myelogram showed normal cellularity and relationship in the series myeloid/erythroid and lymphocytic/megakaryocytic but no search of parasites in bone marrow was conducted in the first instance. After seven days of hospitalization, the child had two daily peaks of fever, his general condition had worsened and a WBC with 836 granulocytes. It was then decided to associate vancomycin to the initial antimicrobial therapy. Finally the infectious diseases were called and visceral leishmaniasis was suspected, with the recommendation to repeat bone marrow aspirate to search for *Leishmania* spp. Blood cultures were negative for bacteria. On the 15th day of hospitalization, we performed computed tomography of the abdomen which revealed that the liver was 13 cm of the diaphragm and the spleen measured 17 cm in length. A new bone marrow aspirate was performed and the new material sent to the Laboratory for Leishmaniasis Surveillance Evandro Chagas Clinical Research Institute, Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro. After Giemsa staining of the material, the presence of numerous amastigotes of *Leishmania* spp. was proven (Fig. 2).



Fig. 1 – LGD, 5 years, with massive hepatosplenomegaly.

The patient was treated initially with pentavalent antimony (antimony N-methyl glucamine) at a dose of 20 mg/kg/day intravenously. After 10 days of use of antimony, as the daily fever remained, it was replaced by amphotericin B deoxycholate. The patient evolved with remission of fever and general improvement; however, he began to show severe hypokalemia, despite intravenous potassium replacement and full-dose regimen of amphotericin B on alternate days. We chose to replace the amphotericin B deoxycholate for liposomal formulation, which was used for more seven days at a dose of 3 mg/kg/day. A blood work done 46 days after admission depicted an improvement towards normal with hematocrit 31%, hemoglobin 10.4 g/%, total leukocyte count 4,400 (64%

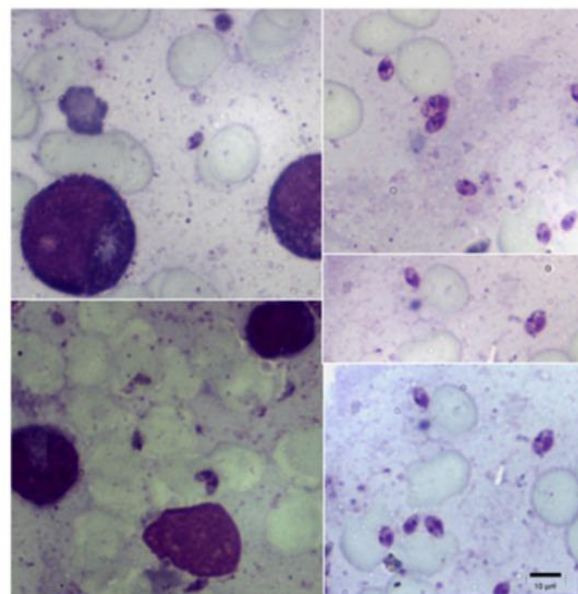


Fig. 2 - Photomicrographs of bone marrow aspirate stained with Giemsa showing numerous amastigote forms of *Leishmania* spp. (1000x).

neutrophils and 43% lymphocytes), platelets 224,000, albumin 3.7g and globulin 2.6 g. The patient was then discharged for outpatient monitoring.

DISCUSSION

The VL has undergone marked epidemiological changes in recent decades. Initially characterized as an anthroponosis typical disease from rural areas of the Northeast, since the 1980s, an expansion to the urban areas of large and medium cities in the Midwest, Southeast and North Brazil^{4,5,7} has been recorded. The disease is mainly prevalent in male children and in children under 10 years old^{4,6,12}. The city of Volta Redonda has never registered cases of VL, which probably hindered the initial clinical diagnosis on admission. The child was left for 11 months without the correct diagnosis. In non-endemic areas, it is recommended to include the diagnosis of VL in all cases of patients with fever and splenomegaly right after other possibilities, more prevalent in the region, are elucidated⁴. Since the beginning it was observed that the child had, in addition to clinical signs, laboratory abnormalities characteristic of the disease, such as pancytopenia, hypoalbuminemia and hyperglobulinemia^{4,6,12}. In his initial hospitalization, we cannot rule out the possibility of bacterial sepsis co-existence, since he improved after ICU admission and use of broad-spectrum antimicrobial. It should be noted that the child made use of amphotericin B deoxycholate for 15 days in its passage through the ICU, which may have contributed to the initial improvement. However, the cumulative dose was lower than recommended to treat the VL, causing the worsening of the disease few months later⁴.

In the acute phase of VL the main differential diagnoses are infectious mononucleosis, toxoplasmosis and cytomegalovirus infection⁶. All

these possibilities were investigated and had negative tests. In the classic presentation with massive hepatosplenomegaly, the VL can be confused with malaria, typhoid, schistosomiasis, prolonged course of enteric bacterial infection and myeloproliferative disorders^{6,9}. Although it presents with fever, cat-scratch disease has, in most cases, a benign course, with involvement of the skin and local lymph nodes, not being included in the differential diagnosis of VL^{2,3,6,9}. The involvement of the liver and spleen is rare and, if affected, they can show abscesses and have considerably less growth^{2,3}. Different from kala-azar, cat-scratch disease shows no increase in the total number of leukocytes and neutrofilia².

Other possible diagnosis for this case was acute lymphocytic leukemia, the most common type in childhood, lymphoblasts can be seen in peripheral blood and bone marrow examination, but this was not observed in this case¹. Lymphomas are rare in childhood and typically include more prominent lymph node enlargement, sometimes with mediastinal involvement¹. The severe form of lymphoma shows atypical lymphocytes in the lymph nodes and bone marrow, which was not seen in the tests of the patient described here¹. It is very unlikely that the possibility of the prolonged course of enteric bacterial infection, since schistosomiasis is not endemic in Volta Redonda¹⁰. The child underwent several courses of antibiotics and reported no travel outside the state. The splenomegaly and anemia in typhoid fever are usually less intense and there was no elevation of serum globulins⁶. Malaria is not considered endemic in Volta Redonda and the few reports by the municipality health team are imported⁸. Although rare in this age group, we must consider the possibility of the juvenile form of paracoccidioidomycosis, often evidenced in the Médio Paraíba, South Fluminense¹⁴. However, lymph node enlargement in the acute phase is usually bulkier and often drains spontaneously through cutaneous fistula. The enlargement in the liver and spleen is less pronounced in the paracoccidioidomycosis. Furthermore we do not observe pancytopenia and neutrophils count tends to be high. The mycological exam of the cervical lymph node biopsy in first hospitalization would have confirmed the diagnosis¹⁵.

Hypokalemia is a frequent adverse effect of the prolonged use of amphotericin B, which was observed in this case¹¹. The resistance to pentavalent antimony in the treatment of VL has been documented in India and Africa, a phenomenon that has also been observed in Brazil⁶. In the latest report of leishmaniasis control from the World Health Organization, liposomal amphotericin B is indicated as an initial drug for the treatment of VL in South America, this opposes the recommendations adopted by the Ministry of Health of Brazil, that indicates antimony as the initial drug of choice^{4,5,16}. New research is needed to better assess this issue.

According to information from the environmental surveillance department in the municipality of Volta Redonda, there were recently captured specimens of *Lutzomyia longipalpis* in the neighborhood of Eucaliptal, next to the Jardim Belmonte, residence address of the patient described. Control measures and identification of infected dogs have been made since then to contain the spread of the disease in the region.

Finally, we emphasize the importance of always investigating VL in patients presenting with clinical signs characteristic of the disease, even in non-endemic areas, thus carrying out an early diagnosis and reducing the lethality of the disease.

RESUMO

Expansão da leishmaniose visceral no estado do Rio de Janeiro, Brasil: relato do primeiro caso autóctone no município de Volta Redonda e a dificuldade de diagnóstico

A leishmaniose visceral vem apresentando mudanças epidemiológicas marcantes nas últimas décadas, com acentuada expansão e surgimento de casos em áreas urbanas do Norte, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. O caso de Calazar aqui relatado, apesar de ser muito característico, apresentou grande dificuldade de diagnóstico, por se tratar de doença não-endêmica em Volta Redonda. A criança passou por duas internações em hospitais diferentes, porém, só obteve o diagnóstico correto após 11 meses do início dos sintomas. Neste relato são discutidos os principais diagnósticos diferenciais e chama-se a atenção de sempre considerar a hipótese de leishmaniose visceral em todo paciente com febre prolongada, hepatosplenomegalia e pancytopenia, mesmo em áreas tradicionalmente não endêmicas.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Clarisse Bressan for her collaboration in the translation of the text into the English language.

REFERENCES

1. Adamson JW. Malignancies of lymphoid cells. In: Harrison's principles of internal medicine. 17th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2008. chap. 105
2. Arisoy ES, Correa AG, Wagner ML, Kaplan SL. Hepatosplenic cat-scratch disease in children: select clinical features and treatment. *Clin Infect Dis*. 1999;28:778-84.
3. Ben-Ami R, Ephros M, Avidor B, Katchman E, Varon M, Leibowitz C, *et al*. Cat-scratch disease in elderly patients. *Clin Infect Dis*. 2005;41:969-74.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica: Leishmaniose visceral. 7^a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.
6. Duarte MIS, Badaró RS. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi R, Focaccia R, editores. Tratado de infectologia. 4^a ed. São Paulo: Atheneu; 2010. v. 2, p. 1707-36.
7. Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, *et al*. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42:570-80.
8. Miguel RB. Estudo da infecção por *Plasmodium* spp no município de Guapimirim, estado do Rio de Janeiro. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
9. Nascimento EL, Medeiros IM. Leishmaniose visceral (Calazar). In: Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias. 3^a ed. São Paulo: Atheneu; 2012. p. 695-701.
10. Prata A. Esquistossomose mansônica. In: Veronesi R, Focaccia R, editores. Tratado de infectologia. 4^a ed. São Paulo: Atheneu; 2010. v. 2, p. 1859-82.
11. Prentice HG, Hann IM, Herbrecht R, Aoun M, Kvaloy S, Catovsky D, *et al*. A randomized comparison of liposomal versus conventional amphotericin B for the treatment of pyrexia of unknown origin in neutropenic patients. *Br J Haematol*. 1997;98:711-8.

SANGENIS, L.H.C.; LIMA, S.R.A.; MELLO, C.X.; CARDOSO, D.T.; MELLO, J.N.; ESPÍRITO SANTO, M.C.C. & TAVARES, W. - Expansion of visceral leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil: report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 56(3): 271-4, 2014.

12. Queiroz MJ, Alves JG, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr*. 2004;80:141-6.
13. Rio de Janeiro (Estado). Tribunal de Contas. Secretaria-Geral de Planejamento. Estudo Socioeconômico 2007: Volta Redonda: histórico e caracterização do município. Rio de Janeiro: Tribunal de Contas; 2007.
14. Rios Gonçalves AJ, Londero AT, Terra GM, Rozenbaum R, Abreu TF, Nogueira AS. Paracoccidioidomycosis in children in the state of Rio de Janeiro (Brazil). Geographic distribution and the study of a "reservarea". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40:11-4.
15. Rios Gonçalves AJ, Terra GM, Passioni LF. Paracoccidioidomycose infanto-juvenil: relato de dez pacientes recentemente observados na cidade do Rio de Janeiro. Revisão da literatura. *Rev Med HSE*. 2000;34. Available from: <http://www.hse.rj.saude.gov.br/profissional/revista/34/parac.asp>
16. World Health Organization. Control of the leishmaniases. Geneva: WHO; 2010. (Technical Report Series; 949)

Received: 28 August 2013

Accepted: 10 October 2013

4.4. ARTIGO 4

High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil

**Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
47(4):521-523, Jul-Ago, 2014**

A LV é uma doença com elevada letalidade, principalmente quando o diagnóstico e o tratamento não são rapidamente realizados. Por essa razão, o Ministério da Saúde instituiu um escore para orientar os profissionais no manejo terapêutico dessa importante doença. No entanto, casos letais ainda ocorrem no Brasil. Entre 2010 e 2013 durante um surto de LV que vem ocorrendo no município de Barra Mansa – RJ observou-se alto índice de letalidade. Esse artigo teve como objetivo descrever uma série de casos ocorridos neste município. O estudo foi feito através da revisão dos prontuários de 9 pacientes diagnosticados com LV. Dos casos descritos nesse relato, 7 (77%) foram elucidados pelo exame direto. Vale ressaltar que a realização do exame direto foi fácil, devido a abundância de formas amastigotas nas preparações. Isso ressalta a importância de tal exame para um diagnóstico rápido da LV. A partir dessa publicação, os profissionais de saúde foram alertados para emergência da LV em Barra Mansa e em regiões vizinhas.

Esse artigo responde parcialmente ao objetivo nº 2 desta tese.



High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil

**Maria Inês Fernandes Pimentel^{[1],[2]}, Elisabeth Larcher Maximiano Alves^[3],
 Maria Hercília Fiuza Farias da Silva^[4], Patrícia Gazenmüller Moza^[2],
 Paula Maria Pereira de Almeida^[2], Cristiane Silveira Cunha^[3], Cíntia Xavier de Mello^[1],
 and Armando de Oliveira Schubach^{[1],[5]}**

[1]. Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. [2]. Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses, Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. [3]. Coordenação de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde de Barra Mansa, Barra Mansa, RJ. [4]. Santa Casa de Misericórdia de Barra Mansa, Barra Mansa, RJ. [5]. Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

ABSTRACT

Introduction: Nine cases of visceral leishmaniasis occurred recently in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro, with a high mortality rate. **Methods:** We reviewed the medical records of the patients. **Results:** Eight were male; 7 were adults. Patients who died progressed to death quickly and presented with aggravating factors: systemic steroid therapy before diagnosis, bleeding, severe liver involvement, infection, and/or refusal to receive transfusion. **Conclusions:** We warn clinicians to be aware of the emergence of visceral leishmaniasis in new areas and to keep in mind the possibility of atypical clinical pictures and aggravating factors, so timely diagnosis can be made and prompt and adequate treatment can be initiated.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Lethality. Epidemiology. Therapy.

Visceral leishmaniasis (VL) is an anthroponosis caused by protozoa of the genus *Leishmania* and is transmitted by infected female sand flies during their blood meals. In the New World, the causative agent is *Leishmania (Leishmania) chagasi*, which is considered to be identical to *Leishmania (Leishmania) infantum* of the Old World¹.

In Brazil, VL is endemic mainly in the states of the Northeast Region, but is also prevalent in the North Region, the Southeast Region, with the State of Minas Gerais having the highest prevalence, and the Midwest Region, with a high prevalence in the State of Mato Grosso do Sul². While VL originally affected rural inhabitants of Brazil, urbanization has resulted in the progressive adaptation of the main VL vector, *Lutzomyia longipalpis*, to the peridomestic^{3,4}, feeding predominantly on domestic dogs and chicken^{5,6} but also on synanthropic animals including opossums^{7,8}. In the oldest VL endemic areas, most patients are male and/or children⁹. However, in the newer VL affected areas, larger numbers of adults have been diagnosed¹, and patients present a more severe clinical picture.

In the State of Rio de Janeiro, several cases of VL occurred during the twentieth century; however, the number of autochthonous cases declined between 2000 and 2009. Since 2010, the incidence of human VL has resurged in Rio de Janeiro, mainly in the Paraíba do Sul River Valley. We examined the cases of human VL that occurred in Barra Mansa between 2010 and 2013 in order to better understand the behavior of VL in a geographic area where it was previously absent.

Through medical record analysis, we were unable to identify any cases of VL in Barra Mansa before 2010. No autochthonous cases of VL were present in the Brazilian diseases notification system (*Sistema de Informação de Agravos de Notificação* - SINAN) for Barra Mansa in the preceding decades. We reviewed the medical records of patients who had a diagnosis of VL in the City of Barra Mansa between November 2010 and September 2013. Nine patients were diagnosed with VL by their clinical picture, by parasitological confirmation through direct examination of bone marrow to visualize amastigotes by microscopy, by culture of bone marrow samples in appropriate media (Nicole-Novy-McNeal [NNN] medium with Schneider medium and 10% fetal bovine serum), and/or by positive specific serology (enzyme-linked immunosorbent assay [ELISA], immunochromatographic test with recombinant antigen rK39 [Kalazar Detect®], or immunofluorescence assay [IFA]).

Eight patients were male. Two were children under 5 years of age and 7 were adults. From the 9 cases, 3 patients presented with previous chronic diseases (heart disease and

Address to: Dr^a Maria Inês Fernandes Pimentel. INI/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Mangueiras, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Phone/Fax: 55 21 3865-9541

e-mail: maria.pimentel@ini.fiocruz.br

Received 31 October 2013

Accepted 22 January 2014

renal insufficiency) and 1 patient was addicted to alcohol and marijuana. A total of 4 patients died. The patients who died presented with bleeding, severe liver involvement, respiratory infection, or infection of unclear origin, or had systemic steroid therapy before diagnosis, and/or refused transfusion due to religious beliefs. The first 3 patients did not recover and died of VL. Patients 1 and 2 were diagnosed with VL post-mortem, although patient 2 had suspicion of VL a

few weeks before death. Patients 4 to 7 recovered after successful treatment with amphotericin B or meglumine antimoniate; however, all were over the age of 40 years. Patient 8 died as a result of a severe liver dysfunction that was caused by VL. Patient 9, who was 26 years old, recovered after treatment with amphotericin B. Human immunodeficiency virus (HIV) serology was negative in all patients. The characteristics of the 9 patients are shown in **Table 1**.

TABLE 1 - Socio-demographic characteristics, clinical features, diagnostic tests, and outcomes of 9 patients from Barra Mansa, State of Rio de Janeiro, Brazil with visceral leishmaniasis that occurred between November 2010 and September 2013.

Patient	Gender	Age	Clinical picture	Duration of the disease until diagnosis	VL serology	Bone marrow	Aggravating factors	Treatment	Outcome
1	Male	2 years 10 months	Typical	2 months	ND	A (post mortem diagnosis)	Steroid therapy, bleeding	Amphotericin B as part of the protocol for febrile neutropenic patients	U
2	Male	37 years	Typical	6 months	ELISA (+), Kalazar Detect®(+)	A	Patient did not accept transfusion; pulmonary infection; severe pancytopenia	None (post mortem diagnosis)	U
3	Male	3 years 10 months	Typical	1 month	IFA 1:160, Kalazar detect®(-)	ND	Infection of unclear origin	Meglumine antimoniate; liposomal amphotericin B, late introduction	U
4	Male	53 years	Typical	3 months	ND	A	No	Meglumine antimoniate	F
5	Female	51 years	Typical	3 months	IFA 1:640, Kalazar Detect®(+)	A	Renal insufficiency	Liposomal amphotericin B	F
6	Male	52 years	Typical	6 months	ND	A	Heart disease	Liposomal amphotericin B	F
7	Male	46 years	Typical	2 months	ND	A	Heart disease; chronic alcoholism and marijuana use	Liposomal amphotericin B	F
8	Male	20 years	Atypical	15 days	IFA 1:160, Kalazar Detect® (+)	Direct exam (-) Culture (+)	Severe liver involvement due to VL	None (early death)	U
9	Male	26 years	Typical	4 months	Kalazar Detect® (+)	A	No	Liposomal amphotericin B	F

VL: visceral leishmaniasis; ND: not performed; A: amastigotes in direct exam; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; Kalazar Detect®: immunochromatographic test with recombinant antigen rK39; IFA: immunofluorescence assay; (+): positive test; (-): negative test; U: unfavorable outcome (death); F: favorable outcome (recovery).

The delayed diagnosis of the first patients, which occurred in a geographical area where VL was not previously observed, had a negative impact on the management of the cases. The patients with VL that were studied in Barra Mansa presented with unusual epidemiological and clinical characteristics, when compared to the reports of patients in areas where VL is endemic: 77.8% (7 out of 9 cases) of patients were adults, although the oldest patients recovered after therapy. In addition, the duration of the disease until clinical status worsened was short in 3 of the 4 patients who died. Furthermore, none of the patients were HIV-positive. In 1 case, the patient presented with an atypical clinical picture with severe liver involvement due to VL that resulted in premature death before treatment was initiated. The mortality rate of 44.4% (4 out of 9 cases) in Barra Mansa was much higher than the average VL mortality rate in the State of Rio de Janeiro in the preceding years (7.8% between 2000 and 2009)¹⁰.

It has been reported previously that in areas of Brazil where VL is endemic, several factors are associated with death in VL patients: HIV co-infection, other associated infections, bleeding, jaundice, severe anemia, older age, co-morbidities, cardiotoxicity due to treatment, and use of meglumine antimoniate in patients with co-morbidities¹¹⁻¹⁵. Some of these factors (bleeding, infection, and co-morbidities) were present in our patients; however, the small number of cases included in this study did not allow for statistical analysis regarding lethality. Importantly, co-morbidities were present in 3 out of the 5 patients who recovered after therapy.

To date, there has been no explanation as to why VL patients in Barra Mansa are older. It is possible that this is related to the fact that Barra Mansa was previously not a VL endemic area, resulting in the lack of previous contact of the older population with the parasite. The Epidemiologic Surveillance Services must remain vigilant in identifying VL infection in older patients in areas where VL was previously not present.

The diagnosis, treatment, and surveillance of cases of VL in Barra Mansa have resulted in the development of necessary control actions, including entomological research, active search for VL infected dogs, and euthanasia of seropositive dogs. In addition, VL is now considered in the differential diagnosis of fever, hepatomegaly, jaundice, and splenomegaly in the municipality of Barra Mansa. Between February 2013 and June 2014, some cases of suspected VL were reported; however, the VL diagnosis was subsequently discarded.

Attention must be given to the neglected disease of VL, as it is important to warn clinicians of the resurgence of VL in the State of Rio de Janeiro. It is necessary for clinicians in new areas where VL has spread to be aware that patients with VL may present with an atypical clinical picture, that the disease may rapidly evolve to a disease of much greater severity, and that co-morbidities and aggravating factors may affect the course of VL. The timely diagnosis of VL will allow for prompt and appropriate treatment to be initiated.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Armando de Oliveira Schubach is the recipient of a fellowship from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Bolsista de Produtividade em Pesquisa)*.

REFERENCES

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. WHO Technical Report Series 949. Geneva: World Health Organization; 2010.
2. Ministério da Saúde. Brasil. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. 2012a. [Cited 2013 May 21]. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lv_entre_1990_e_2011_final.pdf.
3. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica* 1994; 10 (supl 2):359-375.
4. Rangel O, Sampaio SMP, Ciaravolo RMC, Holcman MM. The distribution pattern of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in the peridomiciles of a sector with canine and human visceral leishmaniasis transmission in the municipality of Dracena, São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2012; 107:163-169.
5. Oliveira AG, Galati EA, Fernandes CE, Dorval ME, Brazil RP. Ecological aspects of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) in endemic area of visceral leishmaniasis, Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *J Med Entomol* 2012; 49:43-50.
6. Nascimento BWL, Saraiva L, Teixeira Neto RG, Serra e Meira PCL, Sanguinette CC, Tonelli GB, et al. Study of sand flies (Diptera: Psychodidae) in visceral and cutaneous leishmaniasis areas in central western of Minas Gerais state - Brazil. *Acta Trop* 2013; 125:262-268.
7. Cabrera MA, Paula AA, Camacho LA, Marzochi MC, Xavier SC, Silva AV, et al. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45:79-83.
8. Humberg RM, Oshiro ET, Cruz MS, Ribolla PE, Alonso DP, Ferreira AM, et al. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87:470-472.
9. Ministério da Saúde. Brasil. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. [Cited 2013 September 7]. Available at: http://10.1.1.213/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf.
10. Ministério da Saúde. Brasil. Letalidade de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2011. 2012b. [Cited 2013 September 7]. Available at: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_letalidade_por_lv_entre_1990_e_2011.pdf/
11. Oliveira JM, Fernandes AC, Dorval MEC, Alves ML, Fernandes TD, Oshiro ET, et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:188-193.
12. Alvarenga DG, Escalda PMF, Costa ASV, Monreal MTFD. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:194-197.
13. Brazuna JCM, Silva EA, Brazuna JM, Domingos IH, Chaves N, Honer MR, et al. Profile and geographic distribution of reported cases of visceral leishmaniasis in Campo Grande, State of Mato Grosso do Sul, Brazil, from 2002 to 2009. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:601-606.
14. Araujo VEM, Morais MHF, Reis IA, Rabello A, Carneiro M. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1511.
15. Madalosso G, Fortaleza CM, Ribeiro AF, Cruz LL, Nogueira PA, Lindoso JAL. American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of São Paulo, Brazil. *J Trop Med* 2012; article ID 821572.

4.5. ARTIGO 5

**Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, state of Rio de Janeiro,
Brazil**

**Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
47(6):Nov-Dec, 2014**

Como mencionado anteriormente nesta tese, a LV está em expansão no estado do Rio de Janeiro, alertando os setores responsáveis pelo controle. A partir dos casos humanos descritos em Barra Mansa, uma série de ações foram disparadas para conter o avanço da LV nessa região. Nesse contexto, o papel que o cão doméstico assume no ciclo de transmissão da LV é conhecido e assim, a realização do inquérito canino em Barra Mansa foi realizado, visando interromper o ciclo de transmissão, através da eutanásia de cães sororeatores. O objetivo deste artigo foi relatar os resultados iniciais do inquérito canino realizado em Barra Mansa, alertando para explosão desses casos ocorridos no período de 2011 a 2013.

No período, 3103 cães foram avaliados sorologicamente, dos quais 141 (4,54%) foram positivos e encaminhados para eutanásia na Fiocruz. Desses animais, foram coletadas amostras de diferentes sítios para cultura e os resultados mostraram o isolamento e identificação de *L. chagasi* (sin *L. infantum*) em 116 casos.

A publicação deste artigo foi importante para a confirmação de *Leishmania chagasi* como agente responsável pelos casos de LV ocorridos não só nos casos caninos, mas também nos casos humanos descritos em Barra Mansa. Além disso, a sequência de eventos mostrados neste artigo sugere que a epidemia possivelmente já estava instalada em Barra Mansa, espalhando-se silenciosamente, tornando mais difícil o seu controle.

Esse artigo responde parcialmente ao objetivo nº 2 desta tese.



Outbreak of canine visceral leishmaniasis in Barra Mansa, State of Rio de Janeiro

**Cintia Xavier de Mello^[1], Fabiano Borges Figueiredo^[2],
 Artur Augusto Velho Mendes Júnior^[2], Marina Carvalho Furtado^[2],
 Luciana Freitas Campos de Miranda^[1] and Maria de Fátima Madeira^[1]**

[1]. Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. [2]. Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatooonoses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

ABSTRACT

Introduction: In Brazil, visceral leishmaniasis (VL) has spread to various regions. This study reports canine cases of VL in Barra Mansa, where human VL cases were recently reported. **Methods:** Using the human index case, a canine survey was performed by dual-path platform immunochromatography and enzyme-linked immunosorbent assay. Seropositive animals were euthanized. Cultures were collected to detect *Leishmania* parasites. **Results:** Serological tests detected 141 canine VL cases, and *Leishmania chagasi* were isolated from 82.2% animals. **Conclusions:** *Leishmania chagasi* is in circulation in Barra Mansa. This study broadens information on the parasite's distribution in the State of Rio de Janeiro.

Keywords: Barra Mansa. Canine survey. Canine visceral leishmaniasis.

Visceral leishmaniasis (VL) is of serious public health importance, and affects approximately 1-2 million people annually around the world¹. Autochthonous transmission has been recorded in nearly all Brazilian states. The domestic dog is an important reservoir of infection, therefore constituting a primary target for disease control².

Human cases are rare in the State of Rio de Janeiro, although canine cases have often been recorded over the years in municipalities such as Angra dos Reis, Mangaratiba³, Maricá⁴, and Volta Redonda⁵, and in different urban areas of the capital^{3,6}. Canine VL cases historically precede spatial and temporal human cases⁷; therefore, the geographical expansion of canine cases in the State of Rio de Janeiro has put epidemiological surveillance authorities on alert⁸.

Barra Mansa is a municipality in the Southern region of the state where nine human cases of VL were recently reported⁹. Confirmation of these cases triggered a series of actions in Barra Mansa, in particular, the initiation of a canine survey directed at tracking the occurrence and extent of VL among domestic dogs. In this paper, our focus was to report the initial results of the canine survey in Barra Mansa during the years 2011-2013 and to identify *Leishmania* species in seroreactive animals.

Barra Mansa is a Brazilian municipality in the southern State of Rio de Janeiro. It is located at latitude 22°32'39" S, longitude 44°10'17" W, altitude 381m, and has an area of 547,226km². The average annual temperature is 28°C with rainy summers and a relative humidity of 77%. The population is approximately 177,000 inhabitants. Barra Mansa borders the municipalities of Valença, Quatis, Rio Claro, Piraí, Bananal, Barra do Piraí, Resende, and Porto Real, and forms a conurbation with the Cities of Volta Redonda and Pinheiral¹⁰.

The canine survey included domestic dogs living within a radius of approximately 100 meters of recorded human VL cases. The animals were evaluated by a dual-path platform immunochromatographic test [DPP rapid test; Bio Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil], and DPP-positive animals were confirmed by an enzyme-linked immunosorbent assay [*Ensaio imunoenzimático para diagnóstico da leishmaniose visceral canina* (EIE-LVC); Bio Manguinhos/FIOCRUZ/Rio de Janeiro, Brazil] at the Central Laboratory Noel Nutels [Laboratório Central (LACEN), Rio de Janeiro, Brazil], as recommended by the Ministry of Health⁸. All animals confirmed as seropositive by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were collected and sent for euthanasia at the Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatooonoses/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Euthanasia followed the technical norms defined by Resolution no 714/02 from the Federal Council of Veterinary Medicine and by the screening-culling procedure adopted by the Brazilian Ministry of Health in its Program for Visceral Leishmaniasis Control².

Before euthanasia, the animals were sedated with ketamine (10mg/kg) mixed with acepromazine (0.2mg/kg) and clinically classified as *asymptomatic* (i.e., dogs without clinical signs

Address to: Dra. Maria de Fátima Madeira. Lab Vigileish/IPEC/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Phone/Fax: 55 21 3865-9541

email: fatima.madeira@ipecc.fiocruz.br

Received 22 February 2014

Accepted 29 May 2014

of VL upon physical examination), *oligosymptomatic* (i.e., dogs with 1-3 clinical signs), and *symptomatic* (i.e., dogs that had >3 clinical signs of VL such as emaciation, skin lesions, lethargy, lymph node enlargement, or signs of hepatomegaly or splenomegaly). Euthanasia was performed with an overdose of sodium thiopental 5%. Tissue samples (from liver, spleen, and intact skin fragments) and bone marrow and lymph node aspirates were collected and processed by culture for the isolation of parasites using the protocol described by Madeira et al.³. Tissue samples were first placed in sterile saline solution with antibiotics and an antifungal, and later transferred to a biphasic culture medium (Novy-MacNeal-Nicolle medium + Schneider medium supplemented with 10% fetal bovine serum) and incubated at 27°C ± 1°C, whereas the material obtained by puncture was immediately seeded in test tubes containing the same culture medium. Cultures were examined weekly for 30 days. When positive, they were reserved for etiological characterization by isoenzyme electrophoresis (i.e., multilocus enzyme electrophoresis) which employed five enzymatic systems: malic enzyme (ME, EC1.1.1.40), nucleosidase (NH, EC3.2.2.1), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC1.1.1.49), glucose phosphate isomerase (GPI, EC5.3.1.9), and 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, EC1.1.1.43). *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) and *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) were the reference samples in all experiments.

During the study period, 3,103 dogs were evaluated. Of these, 141 (4.5%) dogs were seropositive and hence euthanized. Promastigote forms were isolated from different sites in 116 (82.2%) euthanized animals (Table 1). Twenty-five euthanized dogs were culture-negative. Among these, 15 dogs were asymptomatic, nine dogs were oligosymptomatic, and one dog was symptomatic.

At least one sample of the isolated organisms from each animal was processed by multilocus enzyme electrophoresis. *Leishmania chagasi* was confirmed in 100% (n = 116) of dogs.

The expansion of VL has been reported in various regions of Brazil, and the results of this study corroborate this. In 1977, in the State of Rio de Janeiro, the first human case of VL occurred in the municipality of Rio de Janeiro. From this case,

the protocol of the canine survey was officially established in 1980 in this state⁶. At that time and in subsequent years, this survey was performed only in certain areas of the City of Rio de Janeiro. However, it has recently been extended to other regions of the state such as Barra Mansa because of the discovery of human and/or canine cases in these regions. The displacement of infected animals and the high adaptability of the vector have been the main reasons for the dispersal of VL in Brazil, and the State of Rio de Janeiro is no exception to this rule. Barra Mansa is bordered by the municipalities of Resende and Volta Redonda where VL cases have also recently been described⁵.

In this respect, a point that should be emphasized is the need for epidemiological surveillance in regions with favorable conditions for the establishment of VL. In Barra Mansa, the presence of *L. chagasi* has been confirmed, which places the region on alert.

Canine seropositivity may vary, depending on the epidemiological characteristics of the region. In Belo Horizonte, is approximately 7% which is an area of intense transmission¹¹. In Barra Mansa, we reported a prevalence of 4.5%. It is interesting that by 2009 canine leishmaniasis seropositivity had already been reported at levels that reached 10% in Barra Mansa¹². At that time, *L. chagasi* was not detected in the dogs studied; however, one dog was infected with *Leishmania braziliensis*. This suggests that canine visceral leishmaniasis (CVL) was perhaps already spreading silently in Barra Mansa, and led to an explosion in the number of cases such as those reported in this paper.

The limitation of serological testing is a major argument against euthanasia of seropositive dogs¹¹. In our study, *L. chagasi* was confirmed by culture in 82% of the 141 euthanized seropositive dogs. This speaks in favor of the routine - DPP followed by enzyme-linked immunosorbent assay that is currently employed for the diagnosis of CVL in Brazil⁸. In 25 seropositive dogs, parasitological confirmation was not possible. This may be explained by the clinical condition of the animal at the time of euthanasia because 15 (60%) dogs were classified as asymptomatic animals. Studies have shown that the chance of parasite isolation is less in asymptomatic dogs than in symptomatic animals¹³.

Another point that should be emphasized is the need for laboratory confirmation, primarily in areas with no record of VL. Human cases have been reported in Barra Mansa; however, this is the first time that *L. chagasi* has been shown in VL cases in this region.

The culture is the standard reference tool for the diagnosis of leishmaniasis; however, this approach is not used in epidemiologic studies^{14,15}.

The isolation of *L. chagasi* from the assessed dogs reinforces the involvement of this animal in the transmission cycle of VL in Barra Mansa. Despite reports of *L. braziliensis* in this region, this study did not detect it in any of the evaluated dogs. In the present study we evaluated a variety of clinical specimen, and the highest rates of positivity were in lymph node fragments, whereas interestingly the lowest rates were in lymph node aspirates. We believe this result may be because of variations

TABLE 1 - Results of parasitological cultures using different clinical specimens from euthanized seropositive dogs.

Clinical specimen	Percentage (number of isolates/number of dogs) (CI:95%)
Lymph node fragment	73.8% (48/65; 84.5-63.0)
Spleen fragment	69.5% (98/141; 77.0-61.9)
Skin fragment	58.5% (38/65; 70.4-46.5)
Bone marrow aspirates	56.7% (80/141; 60.8-52.5)
Lymph node aspirates	52.3% (33/63; 64.6-40.0)

CI95%: 95% confidence interval.

in the volume of material collected by puncture. In recent years, leishmaniasis has been classified, along with other arthropod-borne diseases, as an emerging and re-emerging disease with a spread that can be associated with numerous factors. Barra Mansa, which was previously an area without recorded cases, now has an explosion of VL canine cases. The sequence of events demonstrated in this study suggests that CVL was possibly already initiated and spreading silently. The canine survey continues to be conducted in Barra Mansa, along with health education activities to professionals from different sectors that are aimed at containing the spread of VL in this region.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Evandro Chagas National Institute of Infectology (*Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas*)/*Fundação Oswaldo Cruz* (FIOCRUZ) for the infrastructure to realize the research.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This study was supported by the municipal prefecture of Barra Mansa and the Evandro Chagas National Institute of Infectology (*Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas*)/*Fundação Oswaldo Cruz* (FIOCRUZ). Maria de Fátima Madeira and Fabiano Borges Figueiredo hold a grant from *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) for their productivity in the research.

REFERENCES

- World Health Organization. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2012.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral Americana. Ministério da Saúde: Brasília; 2006.
- Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, et al. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 138:366-370.
- Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:77-78.
- Campos MP, Silva DA, Madeira MF, Velho Jr AA, Figueiredo FB. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22:424-426.
- Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, et al. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:570-580.
- Brazil RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban áreas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013; 45:120-121.
- Coordenação geral de doenças transmissíveis. Coordenação geral de laboratórios de saúde pública. Nota técnica nº 01/2011. Rio de Janeiro; 2011.
- Pimentel MIF, Alves ELM, Silva MHFF, Moza PG, Mello CX, Schubach AO, et al. High lethality of visceral leishmaniasis in Barra Mansa, a new area of transmission in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47:521-523.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Cidades@ [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE. [Cited 2013 September 23]. Available at: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=330040/>.
- Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; e584.
- Figueiredo FB, Bonna IC, Nascimento LD, Costa T, Baptista C, Pacheco TM, et al. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:141-145.
- Almeida AB, Sousa VR, Gasparetto ND, Silva GF, Figueiredo FB, Dutra V, et al. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76:321-324.
- Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, et al. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Vet Sci* 2009; 87:260-262.
- Almeida AB, Sousa VR, Sorte EC, Figueiredo FB, Paula DA, Pimentel MF, et al. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011; 11:1555-1560.

4.6.ARTIGO 6

Thick smear is a good substitute for the thin smear to parasitological confirmation in canine visceral leishmaniasis

Artigo submetido ao periódico “The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene”

No Brasil, a LV é considerada uma doença emergente, cujos padrões epidemiológicos mostram características de difícil controle com tendência a urbanização. O diagnóstico deve ser precoce e o tratamento dos casos humanos deve ser instituído rapidamente visando diminuir os índices de letalidade. Recentemente foi descrito um surto de LV no município de Barra Mansa, estado do Rio de Janeiro e um inquério canino foi iniciado nessa região, recolhendo os cães sororeatores. Os animais foram encaminhados para a Fiocruz para confirmação parasitológica. Avaliaram-se técnicas de concentração da amostra biológica como a gota espessa e a citocentrifugação empregando medula óssea objetivando criar alternativas rápidas para o exame direto. Exames clássicos como a cultura e o esfregaço foram utilizados para as análises.

Dos 92 cães estudados, 85,9% foram positivos na cultura, sendo *L. chagasi* (*sin L. infantum*) a espécie confirmada em todos os casos. Os exames de esfregaço, citocentrifugação e gota espessa alcançaram índices de sensibilidade de 52,8% 47,1% e 77% respectivamente. A confirmação parasitológica da leishmaniose visceral canina (LVC) ainda é desafio, principalmente pelo volume de trabalho que é gerado, seja pelos exames diretos ou outra ferramenta parasitológica. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos que sejam de fácil aplicação e que dêem uma rápida resposta torna-se relevante. A técnica de gota espessa e da citocentrifugação, aqui avaliadas, representam alternativas que certamente poderão dar maior agilidade ao processamento dos exames diretos na LVC.

Esse artigo responde integralmente ao objetivo nº 4 desta tese.

American Journal of Tropical Medicine & Hygiene



Thick smear is a good substitute for the thin smear to parasitological confirmation in canine visceral leishmaniasis

Journal:	<i>American Journal of Tropical Medicine & Hygiene</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	de Mello, Cintia; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses Figueiredo, Fabiano; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatозoonoses em Animais Domésticos Mendes, Artur; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatозoonoses em Animais Domésticos Miranda, Luciana; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses Oliveira, Raquel; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Epidemiologia Clínica Madeira, Maria; Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Vigilância em Leishmanioses
Key Words:	Leishmaniasis, Diagnosis, Protozoan Infections

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

1 **Thick smear is a good substitute for the thin smear to parasitological confirmation**
2 **in canine visceral leishmaniasis**

3 Running Title: Thick smear in diagnosis of CVL

4
5 Cintia Xavier de Mello*¹, Fabiano Borges Figueiredo², Artur Augusto Velho Mendes
6 Júnior², Luciana de Freitas Campos Miranda¹, Raquel Vasconcellos Carvalho de
7 Oliveira³ and Maria de Fátima Madeira¹

8
9 ¹ Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses – Fundação Oswaldo
10 Cruz /FIOCRUZ, Rio de Janeiro/Brazil.

11
12 ² Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatозoonoses em Animais Domésticos –
13 Fundação Oswaldo Cruz /FIOCRUZ, Rio de Janeiro/Brazil.

14
15 ³ Laboratório de Epidemiologia Clínica – Fundação Oswaldo Cruz /FIOCRUZ, Rio de
16 Janeiro/Brazil.

17
18 Key-words: canine visceral leishmaniasis, direct examination, thick smear,
19 cytocentrifugation.

20
21
*Correspondence author

Cintia Xavier de Mello, MSc, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em
Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia (INI), Fundação Oswaldo Cruz
(FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Telefone/Fax: +55 (21)
3865-9541, CEP 21040-360, email: cintia.mello@ini.fiocruz.br

Figure 1	Steps followed for the preparation of a thick smear: (A and B) deposit of 5 μ L of bone marrow on a glass slide placed on a card with a demarcated 1 cm ² area; (C) using the tip, the material is distributed over the entire demarcated area; and (D) the preparation is air dried.
Figure 2	Steps followed during the cytocentrifugation technique: (A) 5 μ L of bone marrow is placed in an Eppendorf tube; (B) 195 μ L of ammonium chloride (0.87%) are added, followed by a 5 min rest for hemolysis; (C) the solution is placed in a device comprising the previously described slide, cytofunnel, and cardboard suitable for cytocentrifugation; and (D) this device is coupled to the equipment and centrifuged at 2500 rpm for 5 min.
Figure 3	(A) Visual aspects of bone marrow preparations for direct examination: thin smear, cytocentrifugation, and thick smear (left to right). (B, C and D) Microscope images of the (B) thin smear (C) thick smear, and (D) cytocentrifugation preparations. Amastigotes are observed in all preparations.
Table 1	Correlation of parasitological culture performed with different clinical specimens, considering the clinical status of seropositive dogs
Table 2	Sensitivity of the direct parasitological exams (smear, thick smear and cytocentrifugation) compared to the reference standard (culture) from 92 seroreactive dogs
Table 3	Statistical power of the comparison of sensitivity values for the direct parasitological exams (thin smear, thick smear, and cytocentrifugation) of 92 seroreactive dogs at a 5% significance level.

22
23

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

Peer Review

1
2
3 24 Abstract. Although direct examination is an important approach when diagnosing
4
5 25 leishmaniasis, such methods are neglected mainly because of their low sensitivities
6
7 26 relative to other techniques. Our study aimed to evaluate the performances of bone
8
9 27 marrow (BM) thick smear and cytocentrifugation tests as alternatives to the direct
10
11 28 examination of canine visceral leishmaniasis (CVL). Ninety-two dogs exhibiting
12
13 29 leishmaniasis seroreactivity were evaluated. The animals were euthanized, and healthy
14
15 30 skin, spleen, popliteal lymph node, and BM puncture samples were cultured in an
16
17 31 approach considered as a reference test. Additionally, direct tests were prepared with
18
19 32 BM samples. Of the 92 dogs studied, 85.9% exhibited positive cultures, and *Leishmania*
20
21 33 *chagasi* was confirmed in all cases. Cytocentrifugation and thin and thick smears
22
23 34 yielded sensitivity rates of 47.1%, 52.8% and 77%, respectively. It was not possible to
24
25 35 associate the dogs' clinical status with culture or direct examination results. To our
26
27 36 knowledge, this was the first study to employ thick smears together with
28
29 37 cytocentrifugation for CVL diagnosis. Our results show that both tests, particularly the
30
31 38 BM thick smear, can provide a rapid and safe alternative to parasitological confirmation
32
33 39 of seroreactive dogs because of the sensitivity and significant reduction in the time
34
35 40 required to read the slides.
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

43 Key-words: Visceral leishmaniasis, direct examination, parasitological diagnosis,
44 cytocentrifugation, thick smear
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

INTRODUCTION

The domestic dog is a main reservoir of visceral leishmaniasis (VL) and acts as an important link in the transmission cycle in urban environments.¹ In Brazil, VL is an expanding disease, and efforts have been made to improve the diagnostic accuracy in dogs.^{2,3} Currently, the dual path platform (DPP) rapid immunochromatographic assay and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; EIA-Canine Visceral Leishmaniasis) are used for diagnostic screening and confirmation in these animals; positive animals are euthanized in an attempt to stop the transmission cycle.^{1,4} This strategy is applied in areas with confirmed cases of human or canine VL wherein parasitological examinations are not conducted because of the required extensive workflow. However, to identification of new areas, parasitological confirmation and identification of the etiological agent are required. For this purpose, usually is employed the culture followed by isoenzyme technique.¹ Direct tests, which are not used in this context, are easy to perform and inexpensive, thus representing a useful alternative, especially in areas with limited resources. However, the low sensitivity values and, in particular, the time required to read the slides remain the main disadvantages.⁵ Techniques aimed at concentrating the clinical sample and thereby reducing the preparation reading area would provide alternatives to counteract these drawbacks. Some techniques based on this principle have already been established and used for certain diseases. Cytocentrifugation is a good example; this is commonly used with biological fluids for the diagnosis of various diseases.^{6,7,8} According to the clinical sample analyzed, hemolyzing solutions can also be added to cell suspensions which provide better disposal of the material to be examined after staining.^{9,6,10} Despite this advantage, cytocentrifugation remains largely unexplored for the parasitological diagnosis of diseases such as malaria, filariasis, and leishmaniasis.¹⁰

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

73 The thick smear test is another method of concentrating clinical materials, more
74 precisely peripheral blood samples. This technique was first described in 1903, and its
75 principle is based on sample concentration on a small area of the slide (approximately 1
76 cm²), with subsequent hemolysis and staining. This test could potentially be used to
77 diagnose blood parasites, although its dedicated use is the diagnosis of malaria and
78 filariasis.^{11,12}

79 Different clinical specimens can be used for the parasitological diagnosis of
80 CVL; however, selection of the best sample remains challenging and there is no
81 consensus in the current literature. This occurs because of the clinical diversity of CVL
82 and strong influence of the animal's disease stage.^{13,14,15,16,17,18} In this context, bone
83 marrow (BM) is a widely used specimen in many different diagnostic techniques and
84 provides acceptable sensitivity values for both symptomatic and asymptomatic dogs^{14,17}
85 Given the importance of direct examination, this study aimed to assess concentration
86 techniques such as thick smear and cytocentrifugation using bone marrow for
87 parasitological confirmation of CVL.

88

89

METHODS AND MATERIALS

Animals and collection of biological samples

91 Ninety-two dogs exhibiting leishmaniasis seroreactivity that originated from a
92 survey carried out in the municipalities of Barra Mansa and Rio de Janeiro (Rio de
93 Janeiro, Brazil) were included in this study. The animals were diagnosed using the DPP
94 test and ELISA and euthanized in the Laboratory of Clinical Research on
95 Dermatozoonosis in Domestic Animals (LAPCLIN DERMZOO/INI/FIOCRUZ)
96 according to the recommendations of the Brazilian Program for Visceral Leishmaniasis
97 Surveillance and Control.¹ Initially, the dogs were sedated with ketamine (10 mg/kg)

1
2
3 98 plus acepromazine (0.2 mg/kg) for clinical examination. Animals without characteristic
4
5 99 signs of CVL were classified as asymptomatic, animals exhibiting 1–3 CVL signals
6
7 100 were oligosymptomatic, and animals exhibiting more than 3 signs were considered
8
9 101 symptomatic. After euthanizing the animals with an overdose of 5% sodium thiopental,
10
11 102 intact skin fragments, spleen, lymph nodes, and BM puncture were collected for
12
13 103 parasitological tests. All procedures performed during this study were approved by the
14
15 104 Ethics Committee for Animal Use of the Oswaldo Cruz Foundation under protocol
16
17 105 number LW-54/13.
18
19
20
21

22 23 107 ***Culture and etiological characterization***

24
25 108 The culture was performed from fragments intact skin fragments, spleen, lymph
26
27 109 nodes and BM puncture in biphasic culture medium Novy-Neal–Nicolle and
28
29 110 Schneider's *Drosophila* medium containing 10% of fetal calf serum. After samples
30
31 111 inoculation, the media were incubated at 26–28°C, and examined weekly for a
32
33 112 maximum of 30 days, according protocols described by Madeira et al.¹⁹ This test was
34
35 113 used as a reference standard in the analysis.
36
37

38
39 114 Positive cultures were grown to obtain parasite mass and then characterized by
40
41 115 enzyme electrophoresis according by Cupolillo et al.²⁰ At least one isolate of each
42
43 116 animal was characterized, using five enzyme systems: 6PGDH (6-phosphogluconate
44
45 117 dehydrogenase, EC.1.1.1.43); GPI (phosphoglucose isomerase, EC.5.3.1.9); NH
46
47 118 (nucleoside hydrolase, EC.3.2.2.1); G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase,
48
49 119 EC.1.1.1.49), and PGM (phosphoglucomutase, EC.1.4.1.9). Reference strains of
50
51 120 *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (L.) chagasi* (*syn. L. infantum*)
52
53 121 (MHOM/BR/74/PP75) and *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) were used in all
54
55 122 electrophoretic runs.
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

123

124 ***Direct exam: thin and thick smears and cytocentrifugation***

125 Approximately 1 mL of BM was collected via puncture from the sternal bone of each
126 dog and added to ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA). Thin smears were
127 prepared to compare direct examinations and comprised the even distribution of
128 approximately 1 μ L of BM on a microscope slide. To prepare a thick smear, 5 μ L of
129 BM were distributed over an area of the slide corresponding to 1 cm² with the aid of a
130 printed card containing the defined area. Once completely dry, the slide containing the
131 thick smear was subjected to both dehemoglobinization and Giemsa staining. For
132 cytocentrifugation, 5 μ L of BM were suspended in 195 μ L of ammonium chloride
133 (NH₄Cl, 0.87%). This suspension was kept at room temperature for 5 min to perform
134 hemolysis. Subsequently, cytocentrifugation (2500 rpm/5 min) was performed to
135 deposit the cells on a 6-mm² area. The slides containing the thin smears and
136 cytocentrifuged material were dried, subsequently fixed with methanol for 5 min, and
137 Giemsa-stained.

138 The preparations were analyzed on a light microscope using the immersion
139 objective (x1000); all microscopic fields were considered for the thick smear and
140 cytocentrifugation. In contrast, at least 2000 fields were observed for the slides with thin
141 smears.

142

143 ***Data analysis***

144 Data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences software
145 (SPSS), version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Chi-square and Fisher's exact
146 tests were performed to estimate the associations between clinical signs and
147 parasitological test positivity. The positivity percent rates and respective confidence

1
2
3 148 intervals (95% CI) were obtained for cultures with different clinical specimens. The
4
5 149 sensitivity and simple agreement were calculated for the direct examinations while
6
7 150 considering the culture as a standard reference test and two situations: (a) culture result
8
9 151 from any analyzed clinical sample and (b) culture results from only the BM sample. At
10
11 152 the end of the study, we calculated the statistical power values to compare the
12
13 153 sensitivity values between each direct examination pair in a sample size of 92 dogs and
14
15 154 at a significance level of 5%.

16
17
18 155 A P-value <0.05 indicated statistical significance.
19
20
21 156

22 23 157 **RESULTS**

24
25 158 The promastigote form of *Leishmania* sp was isolated in cultures of at least one
26
27 159 analyzed sample type (e.g., intact skin, spleen, lymph node or BM) from 85.9% (n = 79)
28
29 160 of the 92 dogs studied. Seventy-three isolates were subjected to etiologic identification,
30
31 161 and all exhibited an electrophoretic pattern compatible with *Leishmania chagasi*.
32
33 162 Regarding the clinical status, 13% (n = 12) of the dogs were considered symptomatic,
34
35 163 29.3% (n = 27) asymptomatic, and 53.3% (n = 49) oligosymptomatic. The clinical data
36
37 164 records of four animals could not be recovered. Of the 13 dogs with negative cultures,
38
39 165 seven were classified as oligosymptomatic, five as asymptomatic, and one as
40
41 166 indeterminate. The correlations between parasitological cultures of different types of
42
43 167 clinical samples and the clinical statuses of seropositive dogs are presented in Table 1.
44
45

46
47 168 Regarding direct examinations of BM, 48 dogs exhibited positive results via
48
49 169 thick smear, 34 via cytocentrifugation, and 31 via thin smear. The specificity of direct
50
51 170 examination was 100%. The sensitivity, consistency, and validity results of direct
52
53 171 examinations are shown in Table 2. The statistical power for comparing test sensitivities
54
55 172 indicated that only situation b yielded a power >90%, confirming that the sensitivity of
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

173 the thick smear was significantly higher than that of cytocentrifugation and thin smear
174 (Table 3).

175 No association was found between the animals' clinical status and positivity in
176 either the culture or direct examination ($p>0,05$).

177 The steps used to prepare the thick smears and cytocentrifuged samples are
178 shown in Figures 1 and 2, respectively. The visual and microscopic appearances of the
179 preparations are shown in Figure 3. On the thick smear and cytocentrifugation slides,
180 the cells became more concentrated, as expected, but exhibited good dispersion. The
181 hemolysis step was satisfactory in both cases and did not prevent the staining and
182 identification of amastigotes.

183
184

DISCUSSION

185 In this paper, we evaluated the performances of techniques used to evaluate the
186 concentration of clinical samples for the parasitological examination of CVL while
187 using cultures as a reference standard. The choice of BM instead of splenic or lymph
188 node puncture samples, accounted for aspects such as the sensitivity of this specimen,
189 which is already known from other studies,^{14,17,21} the risk of collection relative to
190 splenic puncture²², ease of implementation, replication of collections²¹ and, ability to
191 obtain a sufficient sample for use in the different trials studied herein.²³

192 Although serological tools are the most widely used for CVL diagnosis,
193 parasitological data are equally important, particularly when identifying new areas of *L.*
194 *chagasi* circulation. Data in the literature vary greatly regarding selection of the best
195 clinical samples and laboratory techniques, as the clinical status of the dog strongly
196 influences the diagnostic test results.^{14,15} After culturing fragments of skin, Madeira et
197 al.¹³ confirmed the presence of *L. chagasi* in 78% of 394 seroreactive dogs, regardless

1
2
3 198 of clinical status. However, in a study by Almeida et al.,¹⁴ the BM and skin were found
4
5 199 to be the best sites in asymptomatic and the symptomatic dogs, respectively. Using
6
7 200 PCR, the same author reported that lymph node samples yielded better results in
8
9 201 symptomatic dogs. Moreira et al. (2007) reported a sensitivity of approximately 57%
10
11 202 sensitivity in lymph node samples, with values ranging from 75% to 39% according to
12
13 203 the animals' clinical status. Additionally, Saridomichelakis et al.²³ reported values
14
15 204 ranging from 7.8% to 94.7% in lymph node and BM samples in different scenarios,
16
17 205 while considering the aspects described above. These data clearly demonstrate the
18
19 206 complexity of parasitological CVL confirmation. In this study, although different
20
21 207 clinical specimens were evaluated through culture, *L. chagasi* was isolated from 85.9%
22
23 208 of the cases and there was no observed association between this result and the animals'
24
25 209 clinical statuses.

26
27
28
29 210 Although all animals studied herein had been serologically diagnosed with CVL,
30
31 211 in 13 cases the cultures and direct tests were negative. This result does not rule out *L.*
32
33 212 *chagasi* infection and suggests that these animals may have been in the early stage of
34
35 213 the disease with low parasite loads, as none were classified as symptomatic.
36
37 214 Furthermore, in 8 dogs from this group, only spleen and BM samples were examined,
38
39 215 thus reducing the range of samples available for *L. chagasi* research. An interesting and
40
41 216 notable finding was that despite the circulation of other trypanosomatids, such as *L.*
42
43 217 *braziliensis* and *Trypanosoma caninum*^{24,25} in dogs in the state of Rio de Janeiro, all
44
45 218 isolates from the euthanized dogs were identified as *L. chagasi*, thus demonstrating the
46
47 219 efficiency of the serological scheme currently recommended by Brazilian Health
48
49 220 Ministry for the diagnosis of CVL.

50
51
52
53
54 221 Direct examination is an important approach for the diagnosis of leishmaniasis;
55
56 222 however, such methods are neglected mainly because of low sensitivity relative to other
57
58
59
60

1
2
3 223 techniques. The sensitivity of direct examination varies depending on the number of
4
5 224 slides and fields examined.^{23,26} Regina-Silva et al.²⁷, reported a 71% sensitivity rate
6
7 225 after examining slides prepared from four different samples (skin, spleen, lymph node,
8
9 226 and BM) collected from dogs with suspected infection. Teles et al.,²⁸ achieved a 36%
10
11 227 sensitivity rate when evaluating three slides prepared from lymph node samples. In our
12
13 228 study, we obtained a 77% sensitivity rate for BM thick smears, and it is worth noting
14
15 229 that only a 1-cm² area was examined on each slide.

16
17
18 230 In our study the sensitivity of the thick smear was higher than that obtained with
19
20 231 cytocentrifugation and thin smear (at a 5% significance level). Furthermore, thick
21
22 232 smears could be prepared more easily and rapidly than thin smears, as no fixation step
23
24 233 was required and the dehemoglobinization and coloration steps were performed
25
26 234 simultaneously.

27
28
29 235 In contrast, in addition to exhibiting low sensitivity, cytocentrifugation requires
30
31 236 a preprocessing step and special centrifuge, which increases the time required for slide
32
33 237 preparation and test costs, thus making it more expensive than a thin smear.²⁹ The low
34
35 238 sensitivity observed with cytocentrifugation relative to other direct examinations may
36
37 239 be explained by the nature of processing (hemolysis and subsequent centrifugation),
38
39 240 which might destroy the amastigotes. However, the process of hemoglobin removal
40
41 241 used for thick smears did not interfere in this regard.

42
43
44 242 The thick smear and cytocentrifugation techniques allowed the concentration of
45
46 243 five-fold more clinical material in a small area of the slide, thus not only increasing the
47
48 244 likelihood of finding the parasite, but reducing the time required for the exam and
49
50 245 thereby reducing professional exertion. In general, we observed a one-third decrease in
51
52 246 the time required to read the thick smear and cytocentrifugation tests relative to the thin
53
54 247 smear test. These observations demonstrated the promise of the thick smear, as it
55
56
57
58
59
60

1
2
3 248 combines speed, ease of use, low cost, and good sensitivity in a single examination.
4
5 249 Therefore, it is worth mentioning that the thick smear can also be adapted for use with
6
7 250 other biological samples, such as lymph node puncture, or used for the diagnosis of
8
9 251 human VL. In a small pilot study, we evaluated the use of thick smears of human BM
10
11 252 samples and obtained results concordant with the reference pattern (unpublished data).
12
13

14 253 Good preparation and staining are critical for direct examination. In our study,
15
16 254 these factors were better observed in thin smears, likely because hemolysis was not
17
18 255 required in contrast to the cytocentrifugation and thick smear tests. With
19
20 256 cytocentrifugation, we observed that the cells exhibited a somewhat contracted cell
21
22 257 morphology. Note that for any type of direct examination, it is essential to train the
23
24 258 microscopy technician because the specificity and sensitivity of the test also depend on
25
26 259 professional skill. Artifacts or natural pigments such as hemosiderin can confuse the
27
28 260 exam.^{30,31} In our study, we did not experience this difficulty, likely because of the
29
30 261 experience of the professional who conducted such tests.
31
32

33
34 262 Serological surveys are important measures of diseases that require rapid
35
36 263 intervention, such as VL.¹ However, in certain situations the parasitological
37
38 264 confirmation and characterization of *Leishmania* species require the same speed.
39
40 265 Therefore, the use of concentration techniques for direct examination, as described
41
42 266 herein, may be useful. Additionally, as the etiologic agent must be identified, the thick
43
44 267 smear and cytocentrifugation preparations can also be used in molecular assays.^{32,7}
45
46

47 268 To our knowledge, this is the first study to employ thick smears and
48
49 269 cytocentrifugation for CVL diagnosis, and our results show that such tests, particularly
50
51 270 the thick smear, can be a rapid and safe alternative for the parasitological confirmation
52
53 271 of seroreactive dogs.
54
55

56 272
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

273 **Financial support**

274 This study was partially supported by National Counsel of Technological and Scientific

275 Development (CNPq) - PAPES VI program, process number: 407700/2012-9. Maria de

276 Fátima Madeira and Fabiano Borges Figueiredo hold a grant from CNPq for their

277 productivity in the research.

278

For Peer Review

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

279 **Authors:**

280 Cintia Xavier de Mello*, MSc, Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em
281 Leishmanioses (LapClin Vigileish), Instituto Nacional de Infectologia (INI), Fundação
282 Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
283 CEP 21040-360, Telefone/Fax: +55 (21) 3865-9541, email: cintia.mello@ini.fiocruz.br

284 *Correspondence author

285

286 Fabiano Borges Figueiredo, PhD, Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses
287 (LapClinDermzoo), INI, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ,
288 Brasil. CEP 21040-360, Telefone/Fax: +55 (21) 3865-9536, email:
289 fabiano.figueiredo@ini.fiocruz.br

290

291 Artur Augusto Velho Mendes Júnior, Bachelor of veterinary medicine,
292 LapClinDermzoo, INI, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ,
293 Brasil. CEP 21040-360, Telefone/Fax: +55 (21) 3865-9536, email:
294 artur.velho@ini.fiocruz.br

295

296 Luciana de Freitas Campos Miranda, MSc, LapClin Vigileish, INI, FIOCRUZ, Av.
297 Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP 21040-360, Telefone/Fax:
298 +55 (21) 3865-9541, email: luciana.freitas@ini.fiocruz.br

299

300 Raquel Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, PhD, Laboratório de Epidemiologia
301 Clínica, INI, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP
302 21040-360, Telefone/Fax: +55 (21) 3865-9649, email: raquel.oliveira@ini.fiocruz.br

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

303 Maria de Fátima Madeira, PhD, LapClin Vigileish, INI, FIOCRUZ, Av. Brasil 4365,
304 Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP 21040-360, Telefone/Fax: +55 (21) 3865-
305 9541, email: fatima.madeira@ini.fiocruz.br
306

For Peer Review

307 REFERENCES

- 308 1. Ministério da Saúde, 2006. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral
309 Americana. Brasília: Ministério da Saúde.
- 310 2. Schubach EY, Figueiredo FB, Romero GA, 2014. Accuracy and reproducibility of a
311 rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral
312 leishmaniasis in Brazil. *Trans R SoC Trop Med Hyg* 108: 568-574.
- 313 3. de Arruda MM, Figueiredo FB, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JC, de
314 Oliveira MR, Noronha EF, Romero GA, 2013. Validity and reliability of enzyme
315 immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of
316 canine visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS One* 8: e69988.
- 317 4. Ministério da Saúde, 2011. Nota técnica conjunta nº01/2011-GGDT-
318 CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde.
- 319 5. de Mello CX, de Oliveira Schubach A, de Oliveira RV, Conceição-Silva F, Pimentel
320 MI, Lyra MR, E Vasconcelos EC, de Fátima Madeira M, 2012. Comparison of the
321 sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American
322 tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol res*
323 109: 927-933.
- 324 6. Andrejevic-Blant S, Osterheld MC, Caron L, Ballini JP, Monnier P, 2006.
325 Deoxyribonucleic acid content as an indicator of progression of squamous cell
326 carcinogenesis in the esophagus: comparative analysis on imprint-cytospin and tissue
327 section preparation. *Cancer detec prev* 30: 276-283.
- 328 7. Mojica WD, Chen F, 2014. Comparable cytological features between cells processed
329 as either wet mount or conventional cytopins. *Cytopathology*. DOI:
330 10.1111/cyt.12167.
- 331 8. Landry ML, Cohen S, Ferguson D, 2008. Real-time PCR compared to Binax NOW
332 and cytopsin-immunofluorescence for detection of influenza in hospitalized patients.
333 *J Clin Virol* 43:148-151.
- 334 9. Karcioğlu ZA, Fleming JC, Haik BG, 2010. A prospective comparison of fine-needle
335 aspiration cytopathology and histopathology in the diagnosis of orbital mass lesions.
336 *Br J Ophthalmol* 94:128-130.
- 337 10. Petithory JC, Ardoin F, Ash LR, Vandemeulebroucke E, Galeazzi G, Dufour M,
338 Paugam A, 1997. Microscopic diagnosis of blood parasites following a
339 cytoconcentration technique. *The Am j trop med hyg* 57:637-642.
- 340 11. Ministério da Saúde, 2009^a. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília:
341 Ministério da Saúde.
- 342 12. Ministério da Saúde, 2009^b. Guia de Vigilância Epidemiológica e eliminação da
343 filariose linfática. Brasília: Ministério da Saúde.
- 344 13. Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort
345 E, de Paula CC, Bogio A, Gomes MC, Bessa AM, Passos SRR, 2009. Parasitological
346 diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res vet sci* 87,
347 260-262.
- 348 14. de Almeida AB, Sousa VR, Sorte EC, Figueiredo FB, de Paula DA, Pimentel MF,
349 Dutra V, Madeira M de F, 2011. Use of parasitological culture to detect *Leishmania*
350 (*Leishmania*) *chagasi* in naturally infected dogs. *Vector borne zoonotic dis* 11: 1555-
351 1560.
- 352 15. de Almeida AB, Sousa VR, Gasparetto ND, da Silva GF, Figueiredo FB, Dutra V,
353 Nakazato L, Madeira MF, 2013. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic

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

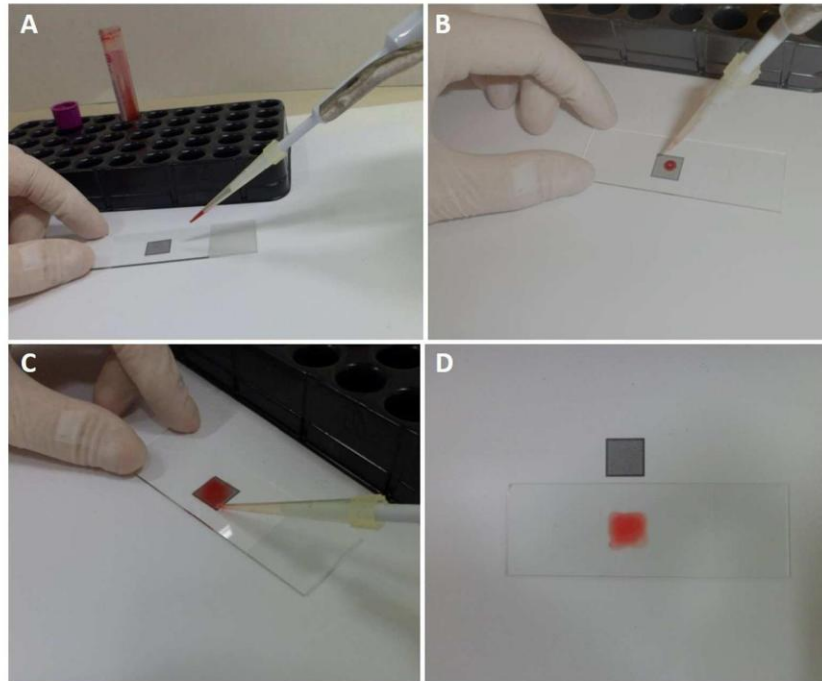
- 1
2
3 354 approaches based on polymerase chain reaction employing different biological
4 355 samples. *Diagn microbiol infect dis* 76: 321-324.
- 5 356 16. Maia C, Nunes M, Cristóvão J, Campino L, 2010. Experimental canine
6 357 leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop* 116:
7 358 193-199.
- 8 359 17. Moreira MA, Luvizotto MC, Garcia JF, Corbett CE, Laurenti MD, 2007. Comparison
9 360 of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of
10 361 leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet parasitol* 145:245-252.
- 11 362 18. Martínez V, Quilez J, Sanchez A, Roura X, Francino O, Altet L, 2011. Canine
12 363 leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Paras vectors* 4:57.
- 13 364 19. Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP., Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C,
14 365 Leal CA, Melo CX, Confort EM, Marzochi MC, 2006. Post mortem parasitological
15 366 evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet*
16 367 *Parasitol* 138: 366-370.
- 17 368 20. Cupolillo E, Grimaldi G. Jr, Momen H, 1994. A general classification of New World
18 369 *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am j trop med hyg* 50: 296-311.
- 19 370 21. Paparcone R, Fiorentino E, Cappiello S, Gizzarelli M, Gradoni L, Oliva G, Manzillo
20 371 VF, 2013. Sternal Aspiration of Bone Marrow in Dogs: A Practical Approach for
21 372 Canine Leishmaniasis Diagnosis and Monitoring. *Journal of Veterinary Medicine*
22 373 Article ID 217314.
- 23 374 22. Solcà M da S., Bastos LA, Guedes CE, Bordoni M, Borja LS, Lorangeira DF, da
24 375 Silva Estrela Tuy PG, Amorim LD, Nascimento EG, de Sá Oliveira GG, Dos-Santos
25 376 WL, Fraga DB, Veras PS, 2014. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic
26 377 testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One* 9:
27 378 e103635.
- 28 379 23. Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C,
29 380 Kontos VI, 2005. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the
30 381 diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and
31 382 asymptomatic dogs. *The Am j trop med hyg* 73: 82-86.
- 32 383 24. Figueiredo FB, Bonna IC, Nascimento LD, Costa TD, Baptista C, Pacheco TM,
33 384 Amendoeira MR, Madeira M de F, 2009. Serological evaluation for detection of anti-
34 385 *Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia,
35 386 municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:
36 387 141-145.
- 37 388 25. Madeira MF, Sousa MA, Barros JH, Figueiredo FB, Fagundes A, Schubach A, DE
38 389 Paula CC, Faissal BN, Fonseca TS, Thoma HK, Marzochi MC, 2009.
39 390 *Trypanosoma caninum* n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a
40 391 domestic dog (*Canis familiaris*) captured in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitology*
41 392 136:411-423.
- 42 393 26. da Silva MR, Stewart JM, Costa CH, 2005. Sensitivity of bone marrow aspirates in
43 394 the diagnosis of visceral leishmaniasis. *The Am J Trop Med Hyg* 72:811-814.
- 44 395 27. Regina-Silva S, Fortes-Dias CL, Michalsky ÉM, França-Silva JC, Quaresma PF, da
45 396 Rocha Lima AC, Teixeira-Neto RG, Dias ES, 2014. Evaluation of parasitological
46 397 examination, kDNA polymerase chain reaction and rK39-based
47 398 immunochromatography for the diagnosis of visceral leishmaniasis in seropositive
48 399 dogs from the screening-culling program in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 47:462-
49 400 468.
- 50 401 28. Teles NM, Agostini MA, Bigeli JG, Noletto RV, Oliveira JD, de Oliveira Junior WP,
51 402 2012. Molecular and parasitological detection of *Leishmania* spp. in dogs caught in
52 403 Palmas, TO, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 21:278-282.
- 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

- 404 29. Saraiva-Romanholo BM, Barnabe V, Carvalho AL, Martins MA, Saldiva PH, Nunes
405 Mdo P, 2003. Comparison of three methods for differential cell count in induced
406 sputum. *Chest* 124:1060-1066.
- 407 30. de Mello CX, Schubach AO, Madeira MF, 2011. Can yeast-like form of *Sporothrix*
408 *schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous
409 leishmaniasis? *Rev Soc Bras Med Trop* 44:127.
- 410 31. Braga AR, Langoni H, Lucheis SB, 2014. Evaluation of canine and feline
411 leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test
412 and polymerase chain reaction. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis* DOI:
413 10.1186/1678-9199-20-5.
- 414 32. Santos TR, Carreira VS, Ferrari HF, Moreira MA, Luvizotto MC, 2014. Comparison
415 of PCR with stained slides of bone marrow and lymph nodes aspirates with suspect
416 diagnosis for leishmaniasis. *Acta Trop* DOI: 10.1016

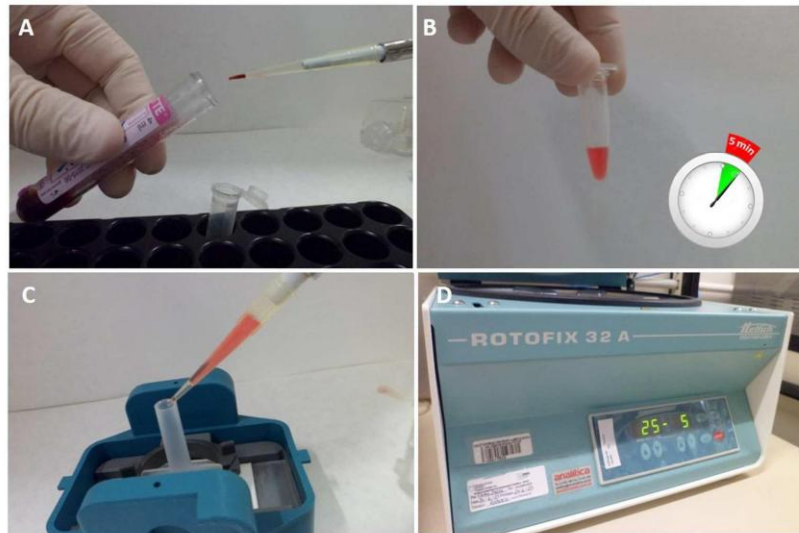
For Peer Review

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



Steps followed for the preparation of a thick smear: (A and B) deposit of 5 μ L of bone marrow on a glass slide placed on a card with a demarcated 1 cm² area; (C) using the tip, the material is distributed over the entire demarcated area; and (D) the preparation is air dried.
182x150mm (300 x 300 DPI)

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

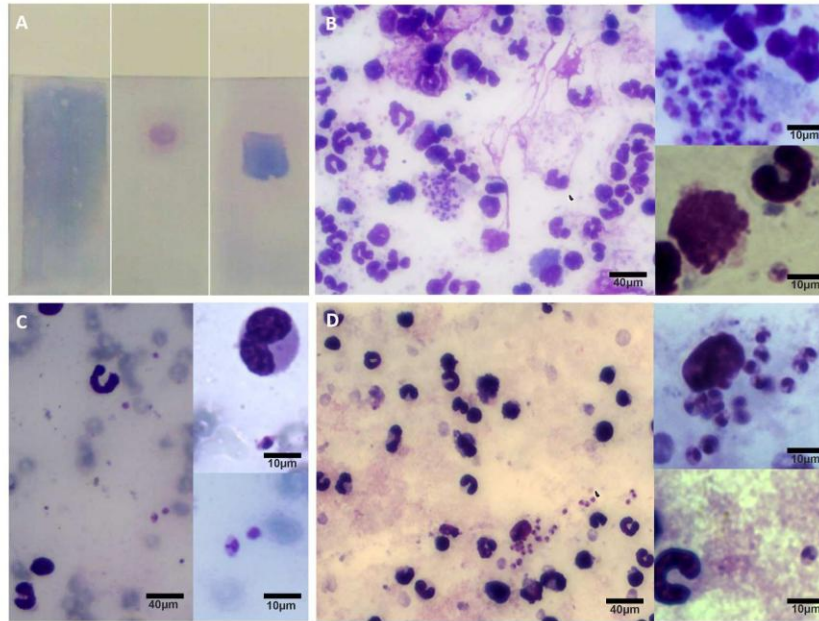


Steps followed during the cytocentrifugation technique: (A) 5 μ L of bone marrow is placed in an Eppendorf tube; (B) 195 μ L of ammonium chloride (0.87%) are added, followed by a 5 min rest for hemolysis; (C) the solution is placed in a device comprising the previously described slide, cytofunnel, and cardboard suitable for cytocentrifugation; and (D) this device is coupled to the equipment and centrifuged at 2500 rpm for 5 min.

203x135mm (300 x 300 DPI)

review

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



(A) Visual aspects of bone marrow preparations for direct examination: thin smear, cytocentrifugation, and thick smear (left to right). (B, C and D) Microscope images of the (B) thin smear (C) thick smear, and (D) cytocentrifugation preparations. Amastigotes are observed in all preparations.
256x191mm (300 x 300 DPI)

Table 1

Correlation of parasitological culture performed with different clinical specimens, considering the clinical status of seropositive dogs

Clinical Status*	Culture results				
	% (n° of positive cases / n° of examined samples) / (CI:95%)				
	Skin (n=42)	Spleen (n=91)	Bone Marrow (n=73)	Lymph node (n=34)	Total (n=92)
Asymptomatic n=27	61.5% (8/13) (90.1-56.0)	73.1% (19/26) (90.1-56.0)	68.2% (15/22) (87.6- 48.7)	70% (7/10) (98.4-41.6)	85,2% (22/27) (78.3-92.0)
Oligosymptomatic n=49	69,6%(15/23) (60.0-79.2)	79,6% (38/49) (73.8-85.3)	74,4%(28/39) (67.4-81.4)	78,9%(14/19) (69.5-88.3)	87,8% (42/49) (83.1-92.7)
Symptomatic n=12	100% (6/6) (100-100)	83,3% (10/12) (100-62.2)	87,5% (7/8) (100-64.6)	100% (5/5) (100-100)	100% (12/12) (100-100)

*Missing=4

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

Table 2

Sensitivity of the direct parasitological exams (thin smear, thick smear and cytocentrifugation) compared to the reference standard (culture) from 92 seroreactive dogs

Direct examination	Sensitivity (a) %(N° positive/N° samples)/ (CI:95%)	%simple agreement(c)	Validity(d)	Sensitivity (b) %(N° positive/N° samples)/ (CI:95%)	%simple agreement(c)	Validity(d)
Cytocentrifugation	43.0% (34/79) (37.4-48.6)	51.0%	75.5%	47,1% (25/53) (40.24-53.9)	56.1%	78.0%
Thick smear	55% (44/79) (44.0-65.9)	66.3%	83.1%	77% (41/53) (65.6-88.3)	75.3%	87.6%
Thin smear	39.2% (31/79) (22.5-43.2)	47.8%	73.8%	52,8% (28/53) (39.3-66.2)	57.5%	78.7%

*Sensitivity: (a) = (number of positive direct examinations/number of positive cultures in all evaluated specimens * 100); (b) (number of positive direct examinations/number of positives in the bone marrow culture * 100), (c) = (number of positives + number of negatives in both tests/total * 100), (d) = (sensitivity + specificity/2)*

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

Table 3

Statistical power of the comparison of sensitivity values for the direct parasitological exams (thin smear, thick smear, and cytocentrifugation) of 92 seroreactive dogs at a 5% significance level.

Direct examination	Sensitivity(a)	Power(a)*	Sensitivity (b)	Power(b)*
Thick smear x	55.0%	31.5%	77.0%	
Cytoentrifugation	43.0%		47.1%	98.5%
Thick smear x	55.0%		77,0%	
Thin smear	39.2%	51.6%	52,8%	91.5%
Thin smear x	39.2%		52.8%	
Cytoentrifugation	43.0%	5.6%	47.1%	9.1%

Sensitivity: (a) = (number of positive direct examinations/number of positive cultures in all evaluated specimens * 100); (b) (number of positive direct examinations/number of positives in the bone marrow culture * 100)

Note: * Power >80% is considered satisfactory.

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

4.7. OUTROS RESULTADOS

Nesta seção apresentaremos os resultados preliminares relacionados à padronização e aplicação da técnica de citocentrifugação com raspados de lesão.

Inicialmente as condições para citocentrifugação foram padronizadas e, com relação às soluções testadas para o processamento, observou-se que com a utilização de ácido acético 2%, álcool 70%, formalina 10%, formalina 2% e saponina 0,4% ocorreu grande destruição celular e prejuízo na coloração. Quando foi empregada solução fisiológica, não foi observada destruição celular, entretanto por não possuir potencial hemolítico, a dispersão das células não foi adequada, ficando as células umas sobre as outras, prejudicando a visualização de formas amastigotas.

A utilização da solução de cloreto de amônio (0,87%) produziu hemólise adequada. Após a centrifugação, observou-se boa dispersão das células, sem prejuízo para a integridade celular, além de não ter prejudicado a coloração. O cloreto de amônio foi então selecionado para o processamento utilizando 50µL do material coletado em solução salina adicionados a 150µL de cloreto de amônio durante 5 minutos.

Foram incluídos no estudo 41 pacientes, dos quais 56% (n=23) pertenciam ao gênero masculino e 68,2% (n=28) residiam no município Rio de Janeiro. A média do tempo de evolução das lesões foi de 7,2 meses e a mediana 2,75 meses. Com relação a localização das lesões 61% (n=25) se apresentavam nas pernas, 24,4% (n=10) se apresentavam nos braços, 12,2% (n=5) no tronco e 2,4% (n=1) na face.

Os principais diagnósticos encontrados foram LTA (n=11,26%), esporotricose (n=8;19,5%), piodermite (n=8;19,5%) e pioderma gangrenoso (n=3;7,3%).

Dos 12 tiveram diagnóstico final de LTA, 8 apresentaram crescimento de formas promastigotas em cultura, 6 foram positivos no exame direto pela citocentrifugação e 5 no exame direto pelo raspado de lesão cutânea demonstrando sensibilidade de 72,7%, 54,5% 45,4% respectivamente.

Dez amostras apresentaram crescimento de fungos e 1 teve crescimento bacteriano em cultura. Todas as formas promastigotas isoladas foram caracterizadas e 7 apresentaram perfil compatível com *L. braziliensis* e 1 com *L. guyanensis*. Os resultados de cada um dos pacientes podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Resultados dos 42 pacientes estudados relacionados ao diagnóstico parasitológico e diagnóstico final atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI, FIOCRUZ, RJ) no período de Abril/2012 a Novembro/2013.

Código	Resultado Cultura	Caracterização Isoenzimas	Escarificação clássica		Citocentrifugação		Resultado final-clínico
			Resultado	Qtf*	Resultado	Qtf*	
1	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
2	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
3	Positivo	<i>L. guyanensis</i>	Positivo	12	Negativo	-	Leishmaniose
4	Positivo	<i>L. braziliensis</i>	Positivo	4	Positivo	12	Leishmaniose
5	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
6	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Úlcera de estase
7	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Leishmaniose cutâneo-mucosa
8	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
9	Contaminado bactéria	-	Negativo	-	Negativo	-	Doença linfoproliferativa
10	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Pioderma Gangrenoso
11	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Úlcera de estase
12	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Leishmaniose
13	Positivo	<i>L. braziliensis</i>	Positivo	13	Positivo	16	Leishmaniose
14	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose
15	Positivo	<i>L. braziliensis</i>	Negativo	-	Negativo	-	Leishmaniose
16	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose
17	Negativo	-	Negativo	-	Positivo	3	Leishmaniose
18	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
20	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Ulceração inespecífica - automutilação
21	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose

Código	Resultado Cultura	Caracterização Isoenzimas	Escarificação clássica		Citocentrifugação		Resultado final-clínico
			Resultado	Qtf*	Resultado	Qtf*	
22	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Pioderma Gangrenoso
23	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose
24	Positivo	<i>L. braziliensis</i>	Negativo	-	Negativo	-	Leishmaniose
25	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose
27	Positivo	<i>L. braziliensis</i>	Negativo	-	Negativo	-	Leishmaniose
28	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
29		-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose
30	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Histoplasmose
31	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Crioglobulinemia
32	Positivo	<i>L. braziliensis</i>	Positivo	55	Positivo	12	Leishmaniose
33	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
34	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Micetoma/esporotricose
35	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Úlcera Flebostática
36	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Úlcera de anemia falciforme
37	Negativo	-	Negativo	-	Positivo	9	Pioderma gangrenoso
38	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Piodermite
39	Positivo	<i>L. braziliensis</i>	Positivo	13	Positivo	18	Leishmaniose
40	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Papulose Linfomatóide
41	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose
42	Contaminado Fungo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose
43	Negativo	-	Negativo	-	Negativo	-	Esporotricose

*Qtf=quantificação de formas amastigotas

5. DISCUSSÃO

Historicamente, os métodos parasitológicos diretos constituíram as primeiras abordagens utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses e o nosso estudo visou valorizar a utilidade desses exames, propondo, nesse contexto, alternativas de amostras clínicas e de formas de processamento.

Os métodos diretos se caracterizam pela simplicidade de execução, justificando investimentos para melhorar o desempenho e a sensibilidade desses testes. O material a ser analisado varia em função da suspeita clínica – leishmaniose visceral ou tegumentar – e facilidade para obtenção do material clínico. Na leishmaniose cutânea, é consenso que a coleta de raspados na lesão cutânea é uma forma simples e pouco invasiva para o exame direto (de MELLO et al, 2012; GARCIA et al, 2007; DURDU et al., 2009; ANGELINE & BONAMONTE, 2011). Entretanto, para o exame direto na suspeita de LV, o espécime a ser coletado para o exame pode variar em função do hospedeiro. Na LV humana, a medula óssea (MO) é a amostra mais empregada para esse fim, mas no cão doméstico é comum serem utilizados, além da MO, amostras puncionadas de ganglios (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

A sensibilidade diagnóstica dos exames diretos normalmente fica abaixo da cultura que constitui o padrão de referência, no entanto, esses exames podem ser uma boa opção em inúmeros aspectos. Na leishmaniose cutânea a sensibilidade do exame direto é relatada em torno de 31% a 71,4 % (NAVIN et al., 1990, de MELLO et al, 2012; BOGGILD et al., 2010) e na LV humana em torno de 77% a 83,6% (MACHADO DE ASSIS et al., 2012; BRUSTOLONI et al, 2007).

Apesar dos métodos diretos serem considerados de baixa complexidade na sua preparação, o mesmo não pode ser atribuído à leitura das lâminas (AL-JITAWI et al., 1995; BRUSTOLONI et al., 2007). Por se tratar de um exame que está sujeito a interpretações subjetivas, o nível de experiência do microscopista exerce influência nos parâmetros de acurácia desse exame. A capacitação contínua dos profissionais que exercem essa atividade é uma forma de contornar essa desvantagem do método (BRUSTOLONI et al., 2007; Organização Mundial de Saúde, 2010, NAMAGEMBE et al., 2012). O Laboratório de

Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClinVigileish) participa dos programas de capacitação de profissionais envolvidos no diagnóstico parasitológico das leishmanioses. Essa atividade é feita desde 2004 e, durante sua execução percebemos a importância da produção de material informativo voltado para esses profissionais. Assim, neste estudo, nos propusemos a elaborar e disponibilizar pranchas coloridas em apoio à prática microscópica. Esse tipo de material é comum para agravos como a malária (MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2009^a), entretanto para as leishmanioses, isso ainda não existia, representando uma lacuna nos manuais de controle, que são disponibilizados pelo Ministério da Saúde. Foram produzidas 2 pranchas, buscando destacar aspectos morfológicos das formas amastigotas do gênero *Leishmania* e como essas formas se apresentam nos exames direto. Além disso, chamamos atenção para estruturas que possam ser confundidas com essas formas. Esse material é apresentado no artigo nº 1 que compõe esta tese. Nos exames diretos, além de artefatos, estruturas leveduriformes podem também ser confundidas com formas amastigotas (de MELLO et al, 2011). Em regiões onde a esporotricose é endêmica, como é o caso do Rio de Janeiro (BARROS et al., 2010), tal encontro pode ser um grande inconveniente para os exames diretos, podendo até mesmo gerar resultados falso positivos. Esse aspecto também foi abordado no artigo nº 1, no qual apresentamos fotomicrografias de formas de leveduras de *Sporothrix schenckii* e *Candida* sp. Na literatura, também existem relatos de que *H. capsulatum* pode causar confusão com formas amastigotas. Entretanto, esse agente não foi encontrado nas lâminas estudadas, não sendo apresentado nas pranchas (SÃO TIAGO et al., 1998).

Considerando os aspectos acima mencionados, é essencial que os programas de controle das leishmanioses incorporem atividades que visem manter a competência dos microscopistas. Várias abordagens podem ser empregadas para essa finalidade, e o material por nós produzido poderá ser de grande valor. Nesse contexto elaboramos um artigo de opinião (artigo 2) que entre outros aspectos discute a importância do treinamento contínuo para realização dessa atividade. Achamos importante ressaltar esse ponto bem como a questão do custo dos exames diretos baseados na experiência que temos acumulado ao longo desses anos.

Implementar e manter tais programas não é uma tarefa fácil, se levarmos em conta a diversidade epidemiológica e econômica nas áreas endêmicas brasileiras. Trabalhos científicos que abordem esse tema, também são raros. Em nossa pesquisa, encontramos um estudo realizado em Belo Horizonte - Minas Gerais, que avaliou a implantação de treinamento das equipes médica, laboratorial e de assistência primária, relacionado ao diagnóstico da LV.

Belo Horizonte é uma região com elevadas taxas de prevalência e letalidade da LV, justificando tal avaliação. Um resultado interessante apresentado nesse estudo foi a demonstração que a letalidade da LV diminuiu cerca de 84,5% nos municípios que implementaram na sua rotina as ações propostas no programa, (LUZ et al.,2009). Esse resultado mostra a importância dos programas de capacitação.

As imagens apresentadas no nosso artigo poderão ser um primeiro ensaio para confecção de um atlas contendo imagens microscópicas, semelhantes aos que já existem para o diagnóstico clínico e diferencial da LTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE; 2006^c) e, de fato atingir os profissionais que se beneficiarão dessas imagens. Essa iniciativa pode ser um diferencial para os programas de capacitação e cursos de reciclagem, constituindo mais uma ferramenta de auxílio nesse processo.

A participação do LapClin Vigileish em programas de capacitação influenciou o desenvolvimento de estudos baseados na padronização e otimização do exame direto. Em um desses estudos, propusemos a padronização do procedimento de escarificação (de MELLO et al, 2012). Devido à facilidade com que os raspados de lesão são obtidos e, por constituir um procedimento pouco invasivo para o paciente, resolvemos avaliar a utilização dos raspados cutâneos em técnicas como a citocentrifugação objetivando otimizar o uso desse espécime clínico. Os resultados obtidos ainda são preliminares para a redação de um artigo e, por essa razão foram apresentados nesta tese na forma de “resultados adicionais”.

A citocentrifugação é uma forma excelente de concentração de células em suspensão, permitindo leituras mais rápidas (SARAIVA-ROMANHOLO et al. 2003). Utilizando raspados processados por citocentrifugação, observamos que os índices de sensibilidade, bem como a quantificação de formas amastigotas, foram semelhantes ao encontrado para os procedimentos clássicos de distensão em lâmina, com a vantagem de reduzir a área para leitura. A diminuição do tempo gasto com a leitura das lâminas foi um dos ganhos que a citocentrifugação trouxe para o exame direto da LTA. Observamos uma redução de 1/3 no tempo despendido para a leitura o que diminui o desgaste do profissional responsável pelo diagnóstico.

A diminuição do número dos casos de LTA no Rio de Janeiro (SINAN, 2014^a) prejudicou a inclusão de pacientes no estudo e conseqüentemente algumas análises que seriam realizadas para avaliar os resultados. Por conta da escassez de amostras não foi possível realizar todos os ensaios de padronização necessários e isso acabou gerando perda de amostras no pequeno grupo estudado.

Embora a LTA esteja em declínio no estado do Rio de Janeiro a LV (humana e canina) está em expansão, causando preocupação nos setores de vigilância e controle do estado. Apesar da leishmaniose visceral canina ser descrita desde a década de 70, nos últimos anos casos de LVC estão sendo relatado em municípios como Angra dos Reis e Mangaratiba (MADEIRA et al., 2006), Maricá (de PAULA et al., 2009), Cachoeira de Macacu (SILVA DA et al., 2011), Volta Redonda (de CAMPOS et al., 2013) e, em áreas urbanas da capital, como nos bairros de Laranjeiras e Caju (FIGUEIREDO et al., 2010; Brazil, 2013). Esses dados mostram a expansão da doença no estado do Rio de Janeiro, mobilizando ações da Secretaria Estadual de Saúde (SES/RJ). O primeiro caso de LV humana no estado do Rio de Janeiro ocorreu em 1977 na região do maciço da Pedra Branca, entretanto, a partir de 1997 raros registros de casos humanos foram realizados (MARZOCHI et al., 2009, SINAN, 2014^b). A facilidade do deslocamento e a alta capacidade de adaptação do vetor têm sido os principais motivos para a dispersão da LV no Brasil e, o estado do Rio de Janeiro não foge a essa regra. *L. longipalpis* tem sido encontrada em áreas completamente urbanizadas nesse estado (Brazil, 2012).

Recentemente foi registrado o primeiro caso humano na área urbana da cidade do Rio de Janeiro, no bairro do Caju (da SILVA et al., 2014), e em outros municípios do estado na região do Vale do Paraíba. Os casos relatados nessa microregião são descritos nos artigos nº 3 e 4 desta tese e o nosso objetivo foi descrever a aplicabilidade do exame direto para o diagnóstico da LV.

Volta Redonda, Resende, Barra Mansa e Barra do Piraí contituem as principais cidades do Vale do Paraíba do Sul Fluminense. Essa região tem sido alvo de investigações devido aos casos de LV recentemente relatados. No ano de 2011 foi registrado um caso autóctone de LV humana em Volta Redonda, município que faz conurbação com Barra Mansa. Esse caso está descrito no artigo nº 3 dessa tese. Nesse relato um dos aspectos que mais chama atenção é o fato de o paciente ter sido submetido a vários procedimentos, sem que a suspeita de LV tivesse sido levantada. Esse caso foi solucionado a partir do exame direto em amostra de medula óssea, coletada numa terceira intervenção. Tal fato ressalta a importância de incluir a LV na investigação de casos com febre de origem indeterminada e também no diagnóstico diferencial de leucemia aguda em crianças (SHEIKH et al., 2003; CHANDRA et al., 2013; VASCONCELOS et al., 2014). Vasconcelos et al. (2014), avaliando uma coorte de 437 crianças, do nordeste, sudeste e centro-oeste do Brasil, com leucemia encontraram 24 amostras de casos de co-infecção por *L. chagasi* (*sin L. infantum*). Esse resultado chama a atenção principalmente por serem duas doenças graves e para o fato que o parasito possa

constituir fator de risco para o desencadeamento do processo de malignidade nas células da medula óssea. Aqui também é importante lembrar a importância do material informativo produzido por nós, o qual poderia auxiliar o profissional que talvez não tivesse conhecimento da morfologia do parasito nas duas intervenções anteriores.

No ano de 2013 foi diagnosticado mais um caso de LV na cidade de Volta Redonda em um paciente do sexo feminino com 23 anos. A paciente negou viagens para fora da cidade e informou ter adotado dois cães de rua doentes cerca de dois meses antes do início dos sintomas. No final de 2014, outro caso foi diagnosticado no município, desta vez em uma criança de 1 ano e 8 meses, que evoluiu a óbito. Esses casos novamente sugerem o estabelecimento do ciclo da LV nesse município.

Na cidade ao lado, Barra Mansa, no período de 2010-2013, foram relatados 9 casos humanos de LV, dos quais, quatro evoluíram para óbito. Esses resultados concordam com MARTINS-MELO et al. (2014) que observaram elevada letalidade da LV em regiões não endêmicas devido, principalmente ao diagnóstico tardio e falta de conhecimento da equipe de saúde. Dos 9 casos ocorridos em Barra Mansa, 7 foram diagnosticados pelo exame direto. Assim, o exame direto foi responsável por elucidar 77% dos casos que estão descritos no artigo nº4. Em um paciente o exame direto foi negativo, entretanto esse paciente tinha apenas 15 dias de evolução da doença e, possivelmente uma carga parasitária baixa para ser identificado por essa técnica. Nesse caso, a cultura, que possui maior sensibilidade, apresentou resultado positivo e concluiu o caso. Nosso laboratório participou ativamente na realização do diagnóstico dos pacientes de Barra Mansa. Dos 7 pacientes que realizaram o exame direto descritos no artigo 3, fomos responsáveis por 5 deles com cerca de 70% dos casos positivos ocorridos neste período, sem levar em consideração as suspeitas que não se confirmaram. Em todas essas análises foram visualizadas inúmeras formas amastigotas nas preparações, o que tornou o diagnóstico fácil e rápido.

Nos casos apresentados aqui, o exame direto se apresentou como uma ferramenta de grande utilidade, pois permitiu o diagnóstico rápido, com baixo custo e com processamento fácil.

O controle do reservatório doméstico é primordial para conter a expansão da LV em áreas urbanas. Casos de LVC recentemente diagnosticados na zona urbana do município do RJ, no bairro do Caju, (SILVA et al., 2014; LYRA et al., 2015) têm sido associados a migração de cães infectados oriundos da região Sul do estado, que foram abandonados nessa localidade. *Lu. longipalpis* também já foi encontrada na região do Caju (Brazil, 2013).

Por conta disso as ações desencadeadas em Barra Mansa foram importantes. A investigação considerou cães domésticos, a partir de um raio de aproximadamente 100 metros de cada caso humano. O resultado da investigação dos cães nessa região, durante o período 2011-2013 foi apresentado no artigo 4 dessa tese. Foi encontrada uma alta prevalência (4,5%) entre os cães o que está de acordo com outros estudos que mencionam que a elevada prevalência canina antecede os casos humanos (BARATA et al., 2013, de ARAUJO et al., 2013). Nesse caso não podemos afirmar que os casos caninos precederam os casos humanos, pois se trata de um estudo seccional. O alto número de casos caninos diagnosticados indica que a epidemia nos cães estava se instalando silenciosamente. Em estudo realizado por Figueiredo et al. (2009), no ano de 2005 no bairro de Santa Rita de Cássia município de Barra Mansa, foi relatado 10% de positividade sorológica em 177 cães, corroborando a hipótese acima levantada. Um dado interessante, foi o não isolamento de *L. chagasi* (*sin L. infantum*) e o encontro de 1 cão com lesão cutânea, comprovando também a presença de *L. braziliensis* nessa região. Já em nosso estudo, todas as amostras isoladas na cultura dos cães oriundos dos inquéritos, foram caracterizadas como *L. chagasi* (*sin L. infantum*) confirmando a etiologia dos casos de LV na região. Essa etapa foi importante para caracterizar a dinâmica da infecção no local e disparar ações de controle específicas.

Todos os animais sororeatores, oriundo do inquérito em Barra Mansa, foram encaminhados para eutanásia, prática recomendada pelo Ministério da Saúde brasileiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^a). Tal recomendação tem sido criticada por grupos de proteção a animais que alegam a inexistência de dados científicos que comprovem a eficácia de tal medida, moderada sensibilidade dos testes sorológicos, a possibilidade de reações cruzadas desses testes e a limitação em distinguir doença ativa de infecção (ROMERO & BOLEART, 2010; SALAM et al., 2012). Por essa razão, a confirmação parasitológica desses cães foi importante para confirmar a circulação do agente em Barra Mansa. Para esse fim, utilizamos não somente a cultura, mas também realizamos o exame direto com algumas modificações, cujos resultados estão mostrados no artigo nº 6.

A LV é um agravo importante que necessita de intervenções rápidas. O cão doméstico possui papel de reservatório, entretanto a confirmação parasitológica desses animais ainda é um desafio. Diversas técnicas empregando diferentes espécimes têm sido avaliadas com essa finalidade, como a utilização de creme leucocitário para pesquisa direta em lâmina (SALAM et al., 2012) e a utilização de “swabs” com material obtido de conjuntiva, orelha e boca para PCR (FERREIRA et al., 2013).

Sabendo da importância do exame direto nesse contexto, decidimos avaliar a aplicabilidade dos exames diretos em amostras de medula óssea em 92 cães eutanasiados oriundos do município de Barra Mansa. O diferencial dessa etapa foi adaptar a utilização da gota espessa e da citocentrifugação nesse exames. Encontramos uma sensibilidade de cerca de 75% com a utilização da gota espessa. A gota espessa possui uso consagrado no diagnóstico da malária, utilizando sangue periférico. Durante um estudo envolvendo o diagnóstico desse agravo foi relatado uma amostra contendo formas amastigotas de *Leishmania* (SHEIKH et al., 2003). Esse dado também aponta para a utilidade da gota espessa para o diagnóstico de parasitos do gênero *Leishmania*.

A gota espessa foi descrita em 1903 e se popularizou pela sua facilidade de execução, baixo custo e elevada sensibilidade quando comparada ao esfregaço tradicional. Em nosso estudo além de utilizar outro espécime clínico (medula óssea) realizamos algumas modificações na técnica como associar as etapas de desmembramento e coloração em um único passo. Isso foi fundamental para diminuir o desprendimento do material depositado na lâmina durante o processamento, já que se trata de material não fixado. Ainda assim, muitas vezes, o esfregaço foi danificado durante o processamento e foram necessárias novas preparações. A realização de arranhaduras na lâmina com a ponta de uma outra lâmina no momento da preparação da gota espessa tem aumentado a aderência do espécime clínico (NORGAN et al., 2013).

Com relação à concentração por citocentrifugação, a diminuição do tempo gasto com a leitura das lâminas foi um dos ganhos que a técnica trouxe, embora a sensibilidade tenha sido semelhante ao esfregaço tradicional. Tal resultado pode ser explicado pelo tratamento com cloreto de amônio que pode ter gerado a destruição de formas amastigotas, apesar do rígido controle de tempo que realizamos durante o processamento da amostra.

Os exames parasitológicos não são utilizados rotineiramente nos inquéritos pois demandam grande volume de trabalho, já que um grande número de cães é avaliado. Entretanto, as metodologias aqui apresentadas constituem alternativas para confirmação parasitológica de fácil aplicação e com resposta rápida. Se considerarmos a complexidade da LV e a possibilidade da ocorrência de reações cruzadas nos testes sorológicos, sobretudo em áreas onde ocorrem outros tripanosomatídeos (MADEIRA et al., 2009) e o fato de que o diagnóstico correto é uma das principais estratégias para o controle, a utilização de tais exames torna-se importante. Adicionalmente, os testes facilitariam a realização do exame direto para definição de áreas novas de transmissão como recomendado pelo Ministério da Saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006^a).

Os valores de sensibilidade dos exames diretos aqui apresentados demonstram o potencial da gota espessa empregando a MO para o diagnóstico da LVC, e por conta disso torna-se relevante a avaliação dessa metodologia para o diagnóstico da LV humana em estudos futuros.

O diagnóstico das leishmanioses é complexo devido ao amplo espectro de manifestações clínicas, seja a forma tegumentar ou visceral. Apesar de algumas limitações como a sensibilidade moderada, o exame direto é, uma das ferramentas mais importantes para o diagnóstico das leishmanioses como foi sugerido pelos trabalhos aqui apresentados. Constitui um exame de certeza, alta especificidade, baixo custo, fácil implantação e necessita de procedimentos pouco invasivos para a coleta dos espécimes. Considerando tais aspectos e a realidade do sistema de saúde brasileiro, entendemos que estudos para otimização da técnica e sua utilização ainda devem ser encorajados. O nosso estudo visou reconhecer o valor desses exames, contribuindo também, com alternativas que poderão dar maior agilidade às etapas de processamento e de leitura.

6. CONCLUSÕES

1. Foram produzidas pranchas, contendo fotomicrografias de formas amastigotas típicas e atípicas de *Leishmania*, estruturas leveduriformes e bactérias de diagnóstico diferencial, para utilização em programas de capacitação profissional para diagnóstico das leishmanioses pelo exame direto;
2. Os exames diretos se mostraram válidos para o diagnóstico das leishmanioses, inclusive para dar respostas rápidas em situações de surtos;
3. A técnica de citocentrifugação empregando raspados de lesões cutâneas foi padronizada, e possibilitou diminuição no tempo de leitura das lâminas, no entanto, são necessários mais estudos com maior número de amostras para melhor avaliação dos parâmetros de acurácia da técnica;
4. A técnica de gota espessa e citocentrifugação empregando amostras de medula óssea foram padronizadas, podendo ser alternativas em potencial na confirmação parasitológica da LVC. A utilização da gota espessa pôde aumentar a sensibilidade da pesquisa direta e diminuir o tempo gasto com a leitura das lâminas.

7. 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.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its Incidence. *Plos one* 2012; DOI: 10.1371/journal.pone.0035671

Andrejevic-Blant S, Osterheld MC, Caron L, Ballini JP, Monnier P. Deoxyribonucleic acid content as an indicator of progression of squamous cell carcinogenesis in the esophagus: comparative analysis on imprint-cytospin and tissue section preparation. *Cancer detec prev* 2006;30(3):276-83.

Angelini G, Bonamonte D. The Tzanck smear: an auspicious return to the past. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011;25(11):1365-6.

Arechavala AI, Bianchi MH, Santiso GM, Lehmann EA, Walker L, Negroni R. [Giemsa stain in the differential diagnosis of infectious diseases with cutaneous involvement]. *Rev Argent Microbiol* 2010;42(4):316.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 2008;24(7):324-30.

Baneth G. Canine leishmaniasis: bridging science, public health and politics. *Vet J* 2013;198(1):9-10.

Barata RA, Peixoto JC, Tanure A, Gomes ME, Apolinário EC, Bodevan EC, de Araújo HS, Dias ES, Pinheiro A da C. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. *BioMed Research International* 2013 Doi: 10.1155/2013/405083.

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.

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.

Bhatia P, Haldar D, Varma N, Marwaha R, Varma S. A case series highlighting the relative frequencies of the common, uncommon and atypical/unusual hematological findings on bone marrow examination in cases of visceral leishmaniasis. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3(1):e2011035.

Boggild AK, Ramos AP, Espinosa D, Valencia BM, Veland N, Miranda-Verastegui C, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A. Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83(2):345-50.

Braga AR, Langoni H, Lucheis SB. Evaluation of canine and feline leishmaniasis by the association of blood culture, immunofluorescent antibody test and polymerase chain reaction. *J venom anim toxins incl trop dis* 2014. DOI: 10.1186/1678-9199-20-5.

Brazil RP, Pontes MC, Passos WL, Fuzari AA, Brazil BG. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the region of Saquarema: potential area of visceral leishmaniasis transmission in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45(1):120-1.

Brazil, RP. The dispersion of *Lutzomyia longipalpis* in urban áreas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2013;45:120-1.

Brustoloni YM, Lima RB, da Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, de Oliveira AL, Pirmez C. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102: 497-500.

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.

Chandra H, Chandra S, Kaushik RM. Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on bonemarrow aspirate cytology in nonendemic region. *J Trop Med* 2013;2013:861032.

Chopra A, Anand M, Kalita D, Singh S, Kumar R. Greater abundance of extracellular *Leishmania donovani* bodies: possible clue from comparison of bone marrow aspirate and imprint findings. *J Clin Pathol*. 2009;62(6):574-5.

Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica* 2008;24(12):2959-63.

Coura-Vital W, Ker HG, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Leal GG, Moreira Nd, Oliveira LA, de Menezes Machado EM, Morais MH, Corrêa-Oliveira R, Carneiro M, Reis AB. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. *PLoS One* 2014;7;9(3):e91009.

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 Silva MR1, Stewart JM, Costa CH. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72(6):811-4.

de Almeida AB, Sousa VR, Sorte EC, Figueiredo FB, de Paula DA, Pimentel MF, Dutra V, Madeira MdeF. Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. *Vector Borne Zoonotic Diseases* 2011;11:1555-60.

de Almeida A.B., Sousa V.R., Gasparetto N.D., da Silva G.F., Figueiredo F.B., Dutra V., Nakazato L., Madeira M.F. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2013;76, 321-4.

de Araújo VE, Pinheiro LC, Almeida MC, de Menezes FC, Morais MH, Reis IA, Assunção RM, Carneiro M. Relative risk of visceral leishmaniasis in Brazil: a spatial analysis in urban area. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7;7(11):e2540.

de Arruda MM, Figueiredo FB, Cardoso FA, Hiamamoto RM, Brazuna JC, de Oliveira MR, Noronha EF, Romero GA. Validity and reliability of enzyme immunoassays using *Leishmania major* or *L. infantum* antigens for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *PLoS One* 2013;26;8(7):e69988.

de Campos MP, da Silva DA, Madeira Mde F, Velho AA Jr, Figueiredo FB. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013.22(3):424-6.

de 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.

de Mello CX, Schubach AO, Madeira MF. Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011; 44,127.

de Mello CX, de Oliveira Schubach A, de Oliveira RV, Conceição-Silva F, Pimentel MI, Lyra MR, E Vasconcellos EC, de Fátima Madeira M. 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. *Parasitology Research* 2012;109, 927-33.

de Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Canine visceral leishmaniasis in Maricá, State of Rio de Janeiro: first report of an autochthonous case. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42:77-8.

de Ruitter CM, van der Veer C, Leeftang MM, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J Clin Microbiol* 2014;52(9):3147-55.

Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, Herdewijn P, Büscher P. Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop Med Int Health* 2008;13(11):1378-83.

Dittus C, Semmel D. Leishmania amastigotes visualized on bone marrow aspirate in a leishmaniasis and HIV coinfecting patient presenting with pancytopenia. *Blood* 2013;122(26):4162.

Drumond KO & Costa FAL. Forty years of visceral leishmaniasis in the state of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2011;53(1):3-11.

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.

Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, Gutierrez Fernandez J. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 2014;13(8):961-72.

Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Kneegt-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

Ferreira Sde A, Almeida GG, Silva Sde O, Vogas GP, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Nasal, oral and ear swabs for canine visceral leishmaniasis diagnosis: new practical approaches for detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013, 4;7(4):e2150.

Figueiredo FB, Bonna I.C., Nascimento L.D., Costa T.d., Baptista C., Pacheco T.M., Amendoeira M.R., Madeira M. de F. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2009,42, 141-5.

Figueiredo FB, Barbosa Filho CJL, Schubach EYP, Pereira SA, Nascimento LD, Madeira MF. Report on an autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in the southern zone of the municipality of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010^a. 43:98-9.

Figueiredo FB, Madeira MF, Nascimento LD, Abrantes TR, Mouta-Confort E, Passos SR, Schubach TM. Canine visceral leishmaniasis: study of methods for the detection of IgG in serum and eluate samples. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2010^b;52(4):193-6.

Lutzomyia França, 1924, *J. Sci. Math, Phys, Nat.*, Lisboa, (3), 17:10 (tipo: flebotomus longipalpis Lutz & Neiva, 1912).

Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans Royal Soc of Trop Med Hyg* 2007;101(4):368-71.

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

Griensven JV, Diro E. Visceral Leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2012; 26(2), 309–322.

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

Gupta LK, Singhi MK. Tzanck smear: a useful diagnostic tool. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2005;71(4):295-9.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology* 2011, 27(9):403-9.

Hosseinzadeh M, Omidifar N, Lohrasb MH. Use of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping method. *Trop Doct* 2012;42(2):112-3.

Karcioglu ZA, Fleming JC, Haik BG. A prospective comparison of fine-needle aspiration cytopathology and histopathology in the diagnosis of orbital mass lesions. *British J ophthal* 2010;94(1):128-30.

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.

Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G. Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(6):e1155.

Kumar PV, Vasei M, Sadeghipour A, Sadeghi E, Soleimanpour H, Mousavi A, et al. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29(2):77-80.

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

Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Impact of sample type on rapid detection of influenza virus A by cytospin-enhanced immunofluorescence and membrane enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):429-30.

Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Real-time PCR compared to Binax NOW and cytospin-immunofluorescence for detection of influenza in hospitalized patients. 2008; 43(2):148-51.

Laurenti MD, de Santana Leandro Jr. MV, Tomokanea TY, de Luccab HRL, Aschara M, Souza CSF et al. Comparative evaluation of the DPP[®]CVL rapid test for canineserodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2014;205:444-50

Luz ZM, Carneiro M, Schall V, Rabello A. The organization of health services and visceral leishmaniasis: an integrated intervention to improve diagnosis and treatment. *Cad Saude Publica* 2009;25:1177-1184.

Machado de Assis TS, Rabello A, Werneck GL. Latent class analysis of diagnostic tests for visceral leishmaniasis in Brazil. *Trop Med Int Health.* 2012 doi: 10.1111/j.1365-3156.2012.03064.x.

Madeira MF, Schubach AO, Schubach TMP, Pereira AS, Figueiredo FB, Baptista C, et al. Post mortem parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet parasitol* 2006;138: 366-70.

Madeira MF, Figueiredo FB, Pinto AG, Nascimento LD, Furtado M, Mouta-Confort E, de Paula CC, Bogio A, Gomes MC, Bessa AM, Passos SR. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? *Res Vet Sci* 2009;87(2):260-2.

Maia C, Nunes M, Cristóvão J, Campino L. Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Tropica* 2010;116,193-9.

Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988;82(4):566-7.

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.

Martínez V., Quilez J., Sanchez A., Roura X., Francino O., Altet L. Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Paras vectors* 2011;4:57.

Martins-Melo FR, Lima Mda S, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. *PLoS One* 2014;9(4):e93770.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MRR. Leishmaniose Visceral (Calazar). *Jornal Brasileiro de Medicina* 1981;42:69-84.

Marzochi MCA, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira MF, Mouta-Confort E, Schubach AO, Marzochi KBF. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil:eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42:570-80.

Medeiros JF, Pessoa FAC, Martins M. The importance of thick blood film method for sympatric filarial diagnosis in Amazon basin. *Acta Amaz* 2010;40(4):779-80

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral Americana. Brasília: Ministério da Saúde; 2006^a.

Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral grave: normas e condutas. Brasília: Ministério da Saúde; 2006^b.

Ministério da Saúde. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília: Ministério da Saúde; 2006^c.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2007.

Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Brasília: Ministério da Saúde; 2009^a

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica e eliminação da filariose linfática. Brasília: Ministério da Saúde; 2009^b.

Ministério da Saúde. Nota técnica conjunta nº01/2011-GGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008;24(8):371-7.

Mojica W.D., Chen F. Comparable cytological features between cells processed as either wet mount or conventional cytopins. *Cytopathology.* 2014. Doi: 10.1111/cyt.12167.

Moreira ED Jr., de Souza VMM, Sreenivasan M, Nascimento EG, Carvalho LP. Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. *Veterinary Parasitology.* 2004;122: 245–52.

Moreira M.A., Luvizotto M.C., Garcia J.F., Corbett C.E., Laurenti M.D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology* 2007;145:245-52.

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

Namagembe A, Ssekabira U, Weaver MR, Blum N, Burnett S, Dorsey G, Sebuyira LM, Ojaku A, Schneider G, Willis K, Yeka A. Improved clinical and laboratory skills after team-based, malaria case management training of health care professionals in Uganda. *Malar J.* 2012;13;11:44.

Nateghpour M, Edrissian G, Raeisi A, Motevalli-Haghi A, Farivar L, Mohseni G et al. The Role of Malaria Microscopy Training and Refresher Training Courses in Malaria Control Program in Iran during 2001 – 2011. *Iranian J Parasitol* 2012;7:104-109.

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.

Norgan AP, Arguello HE, Sloan LM, Fernholz EC, Pritt BS. A method for reducing the sloughing of thick blood films for malaria diagnosis. *Malar J* 2013;12:231.

Nunes CM¹, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, Burattini MN. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2008;153(1-2):19-23.

Organização Mundial de Saúde. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization, 2010.

Petithory J.C., Ardoin F., Ash L.R., Vandemeulebroucke E., Galeazzi G., Dufour M., et al. Microscopic diagnosis of blood parasites following a cytoconcentration technique. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1997;57:637-42.

Pimentel MIF, Alves, ELM, da Silva MHFF, Moza PG, de Almeida PMP, Cunha CS, de Mello CX, Schubach AO. High visceral leishmaniasis mortality rate in Barra Mansa, a new area of visceral leishmaniasis transmission in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014, 47(4):521-3.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2009;136(14):1915-34.

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.

Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol* 2014;3(6):147-54.

Robier C, Neubauer M, Stettin M, Lunzer R, Rainer F. Dried cytopspin preparations of synovial fluid are a stable material for long-time storage and delayed crystal analysis. *Clin Rheumatol*. 2012;31(7):1115-6.

Romero GA & Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010, 19;4(1):e584.

Ross, R. An improved method for the microscopical diagnosis of intermittent fever. *The Lancet* 1903.

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

Salam MA, Khan MG, Bhaskar KR, Afrad MH, Huda MM, Mondal D. Peripheral blood buffy coat smear: a promising tool for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3):837-40.

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

Saraiva-Romanholo BM, Barnabe V, Carvalho AL, Martins MA, Saldiva PH, Nunes Mdo P. Comparison of three methods for differential cell count in induced sputum. *Chest*. 2003;124(3):1060-6.

Saridomichelakis M.N., Mylonakis M.E., Leontides L.S., Koutinas A.F., Billinis C., Kontos V.I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005;73:82-6.

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

Schubach EY, Figueiredo FB, Romero GA. Accuracy and reproducibility of a rapid chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014;108(9):568-74.

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.

Sheikh NS, Sheikh AS, Hussain SI, Sheikh AA. Utility of thick smears of bone marrow aspirate in pyrexia of unknown origin. *Journal of the College of Physicians and Surgeons—Pakistan* 2003;13:577-80.

Silva DT, Starke-Buzetti WA, Alves-Martin MF, Paixão Mdos S, Tenório Mda S, Lopes ML. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. *Rev Bras Parasitol Vet* 2014^a;23(2):179-86.

Silva DA, Perié CSFS, Mendes AAM, Madeira MF, Figueiredo FB. Canine visceral leishmaniasis in Cachoeiras de Macacu, Rio de Janeiro – relato de caso. *Clinica veterinária* 2011;95:64-8

Silva GA, Boechat Tde O, Ferry FR, Pinto JF, Azevedo MC, Carvalho Rde S, Motta RN, Veras MF. First case of autochthonous human visceral leishmaniasis in the urban center of Rio de Janeiro: case report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2014^b;56(1):81-4.

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

SINAN^a [HOMEPAGE NA INTERNET]. [ACESSO EM 26/08/14] DISPONÍVEL EM: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/ita/bases/ltabrnet.def>

SINAN^b [HOMEPAGE NA INTERNET]. [ACESSO EM 26/08/14] DISPONÍVEL EM: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>

Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 2011;4:86.

Solcà M.da S., Bastos L.A., Guedes C.E., Bordoni M., Borja L.S., Lorangeira D.F., da Silva Estrela Tuy P.G., Amorim L.D., Nascimento E.G., de Sá Oliveira G.G., Dos-Santos WL..., Fraga D.B., Veras P.S., 2014. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS One* 9, e103635.

Sousa AQ, Pompeu MM, Frutuoso MS, Lima JW, Tinel JM, Pearson RD Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 2014;91(5):905-7.

Souza GD, Santos Ed, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(8):1181-2.

Souza MA, Sabroza PC, Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS. Flebotomíneos da área de procedência de caso humano autóctone. Mem Inst Oswaldo Cruz 1981;76:161-8.

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.

Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: developments over the last decade. Parasitol Res 2012;110(3):1065-78.

Teixeira-Neto R, da Silva E, Nascimento R, Belo V, de Oliveira C, Pinheiro L, Gontijo C. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. Parasit Vectors 2014; 20;7(1):485.

ul Bari A, Azam S, Ejaz A, Mahmood T. Comparison of various cytodagnostic tests in the rapid diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Journal of Pakistan Association of Dermatologists 2010; 20: 63-69.

Vasconcelos GM, Azevedo-Silva F, dos Santos Thuler LC, Pina ET, Souza CS, Calabrese K, Pombo-de-Oliveira MS. The concurrent occurrence of *Leishmania chagasi* infection and childhood acute leukemia in Brazil. Rev Bras Hematol Hemoter 2014;36(5):356-62.

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

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.

Zanette MF, Lima VM, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF, Biondo AW, Marcondes M. Serological crossreactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. Rev Soc Bras Med Trop 2014;47(1):105-7.

Zuben AP, Angerami RN, Castagna C, Baldini MB, Donalisio MR. The first canine visceral leishmaniasis outbreak in Campinas, State of São Paulo Southeastern Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014,47(3):385-8.