



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

CLAUDÊNIA COSTA PRACIANO

PRESS IMPRINT SMEAR: UM MÉTODO SIMPLES, RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO
NO DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

FORTALEZA
2014

CLAUDÊNIA COSTA PRACIANO

PRESS IMPRINT SMEAR: UM MÉTODO SIMPLES, RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Patologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para a obtenção
de título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Sousa
Co-orientador: Prof(a). Dra. Margarida Maria de
Lima Pompeu

FORTALEZA
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

P911p

Praciano, Claudênia Costa.

Press Imprint Smear: um método simples, rápido e de baixo custo no diagnóstico de leishmaniose cutânea

/ Claudênia Costa Praciano. – Fortaleza, 2014.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Patologia, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Sousa.

Coorientação: Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Diagnóstico. 3. Imuno-Histoquímica. I. Título.

CDD 616.9364

CLAUDÊNIA COSTA PRACIANO

PRESS IMPRINT SMEAR: UM MÉTODO SIMPLES, RÁPIDO E DE BAIXO CUSTO NO
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso
de Pós-Graduação em Patologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para a obtenção
de título de Mestre em Patologia.

Aprovada em 29/07/2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anastácio de Queiroz Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Mônica Cardoso Façanha
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Dionne Bezerra Rolim
Universidade de Fortaleza - Unifor

A Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que está sempre presente na minha vida e que me dá forças para continuar perseverando mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha família, que sempre me apoiou e esteve do meu lado, fazendo todo o possível para que nunca me faltasse nada e que eu não desistisse dos meus sonhos.

Ao meu orientador, Dr. Anastácio de Queiroz Sousa, por ter me ajudado a desenvolver esse trabalho e que contribuiu grandemente na minha formação.

À Prof(a). Margarida Maria de Lima Pompeu, que me ensinou grandes lições de responsabilidade e compromisso, que me fizeram crescer como estudante e como pessoa.

À Prof(a). Danielle Malta, que também me deu lições valiosas de como me tornar uma boa pesquisadora e que sempre se preocupou comigo, mesmo quando não estávamos trabalhando em um mesmo projeto.

À Prof(a). Maria Jania Teixeira, que além do vasto conhecimento passado, sempre me recebeu com uma palavra amiga e um sábio conselho.

Ao Prof. José Wellington de Oliveira Lima que colaborou na realização da análise estatística do trabalho.

A todos os professores do Laboratório de Parasitologia, que foram de fundamental importância na minha formação.

Aos professores do Curso de Pós Graduação em Patologia, pelo rico conhecimento transmitido.

Aos colegas de pesquisa que me ajudaram de forma direta ou indireta, em especial à Daniela Monteiro, Juliana Montezuma, Mércia Sindeaux, Allan Rodrigo, Sayonara Melo, Priscila Guerra, João Victor, Pedro Sindeaux, Udevanier Rebouças, Renata Allana, Naya Rodrigues, Brunhild Maia, Natália Vasconcelos e Brunna Nery, que sempre me apoiaram, com sorriso e disposição.

À Raissa Matos, que esteve do meu lado sempre me ajudando no que fosse possível e nunca deixando eu me abater pelas dificuldades. Agradeço por todos os seus puxões de orelha e também pelos abraços, igualmente importantes no meu crescimento.

A todos os funcionários dos laboratórios que ajudaram grandemente na realização dos trabalhos de pesquisa, em especial à Kélvia Miranda, Suzana Moreira, Alceu Machado, Josyane Conceição, Alísio Bandeira, Lucineide de Sousa, Débora Cavalcante e à Graziela Cavalcante.

À Paula da Paz e à Valéria Cordeiro, secretárias da Coordenação do Curso de Pós Graduação em Patologia, que sempre estavam dispostas a ajudar.

Aos funcionários do Hospital São José de Doenças Infecciosas.

Aos pacientes participantes deste estudo.

Ao Curso de Pós Graduação em Patologia, pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), pelo apoio financeiro.

A todas as outras pessoas que de forma direta ou indireta influenciaram na minha formação pessoal e profissional.

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter,
método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar,
graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar,
direção ao progredir e perfeição ao concluir”
(Santo Tomás de Aquino).

RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da leishmaniose, com 1 milhão de novos casos por ano. Apresenta um amplo espectro clínico, podendo ser confundida com outras doenças que acometem a pele. Desse modo, é de fundamental importância o diagnóstico rápido e preciso da doença. O diagnóstico parasitológico é o mais utilizado na rotina laboratorial, entretanto o exame direto geralmente apresenta baixa sensibilidade. Em virtude disso, torna-se necessário buscar técnicas alternativas para o diagnóstico das leishmanioses. Neste trabalho, comparou-se o teste do *press imprint smear* com o exame histológico e a imuno-histoquímica, no diagnóstico direto de leishmaniose cutânea. Pacientes com suspeita clínica de LC foram submetidos à coleta de duas biópsias da borda das lesões, com *punch* de 3 mm, para a realização dos testes: *press imprint smear*, exame histológico e imuno-histoquímica. Este último foi considerado o teste padrão ouro. O *press imprint smear* consistiu em esmagar o fragmento de biópsia entre duas lâminas de vidro sob pressão, de tal modo que o extrato (suco) tissular se espalha na superfície das duas lâminas. Os esfregaços foram corados com Giemsa, para pesquisa de amastigotas. Outro fragmento foi fixado em formalina a 10%. Desta amostra, uma lâmina foi utilizada no exame histológico, corada com hematoxilina-eosina, e outra para o teste de imuno-histoquímica. Ao total, foram incluídos 78 pacientes com diagnóstico clínico-epidemiológico de LC. A técnica do *press imprint smear* e o exame histológico foram realizados na amostra de todos os pacientes. Entretanto, a imuno-histoquímica foi realizada em apenas 73 amostras. Setenta e dois (98,6%) foram positivos para *Leishmania* na imuno-histoquímica, com sensibilidade de 98,6%; o *press imprint smear* foi positivo em 48 pacientes (61,5%), com sensibilidade de 58,3%. No exame histológico foram identificadas amastigotas em 35 pacientes (44,9%), apresentando sensibilidade de 45,8%. Os resultados mostraram que o *press imprint smear* apresentou maior sensibilidade do que o exame histológico, para o diagnóstico da leishmaniose cutânea. Além disso, é uma técnica de baixo custo e fácil execução.

Palavras-chave: leishmaniose cutânea, diagnóstico, *press imprint smear*, imuno-histoquímica.

ABSTRACT

The cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of leishmaniasis, with 1 million new cases per year. Presents a broad clinical spectrum, which may be confused with other diseases that affect the skin. Thus, it is of fundamental importance to rapid and accurate diagnosis of the disease. Parasitological diagnosis is the most used test in laboratory routine, however direct examination generally has low sensitivity. As a result, it becomes necessary to find alternative techniques for the diagnosis of leishmaniasis. This study compared the test press imprint smear with histological examination and immunohistochemistry, for the direct diagnosis of leishmaniasis. Patients with clinical suspicion of LC underwent a sampling from two samples of biopsies from the edge of the lesions, with a punch of 3 mm for the tests: press imprint smear, histological examination and immunohistochemistry. The latter was considered the gold standard test. The press imprint smear consisted in crushing the biopsy fragment between two glass plates under pressure so that the extract (juice) tissue spreads on the surface of the two blades. The smears were stained with Giemsa for the detection of amastigotes. Another fragment was fixed in 10% formalin. From this sample, a blade was used in histology, stained with hematoxylin-eosin, and one for the immunohistochemical test. In total, 78 patients were included with clinical and epidemiological diagnosis of LC. The press imprint smear technique and histologic examination were conducted on the sample of all patients. However, immunohistochemistry was performed in only 73 samples. Seventy-two (98,6%) were positive for leishmania in immunohistochemistry, with sensitivity of 98,6%; the press imprint smear was positive in 48 patients (61,5%), with sensitivity of 58,3%. In the histological examination were identified amastigotes in 35 patients (44,9%), with sensitivity of 45,8%. The press imprint smear was more sensitive than histological examination for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. In addition, a technique is inexpensive and easy to perform.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, diagnosis, press imprint smear, immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de novos casos relatados de leishmaniose cutânea (LC) no mundo em 2012.	17
Figura 2 - Gráfico do número de casos e coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, de 1989 a 2008.	18
Figura 3 - Gráfico do número de casos e coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar americana (por 100 mil habitantes) no Ceará, de 2004 a 2008.	19
Figura 4 - Tabela do número de casos de leishmaniose tegumentar registrados em Fortaleza, de 2001 a 2005.	19
Figura 5 - Formas promastigotas da <i>Leishmania</i> .	21
Figura 6 - Formas amastigotas de <i>Leishmania</i>	21
Figura 7 - Fêmea de flebotomíneo <i>Lutzomia longipalpis</i> se alimentando.	22
Figura 8 - Ciclo biológico da Leishmaniose.	24
Figura 9 - Forma cutânea.	26
Figura 10 - Forma mucosa.	26
Figura 11 - Forma cutânea difusa.	26
Figura 12 - Forma cutânea disseminada.	26
Figura 13 - Fluxograma dos exames realizados.	37
Figura 14 - Passos do <i>press imprint smear</i> . A e B: Biópsia sendo pressionada entre duas lâminas. C: Material sendo distendido sobre a lâmina. D: Lâmina corada pelo Giemsa.	38
Figura 15 - Lâmina de imuno-histoquímica. Controle positivo com diluição de anticorpo na diluição de 1/600. (Aumento 1000x).	39
Figura 16 - Microfotografia de esfregaço de <i>press imprint smear</i> , evidenciando uma amastigota (seta). (Aumento 1000x).	45
Figura 17 - Microfotografia de corte histológico de amostra de lesão de paciente com suspeita de LC, apresentando amastigotas no campo. (Aumento 1000x).	46
Figura 18 - Microfotografia de lâmina de imuno-histoquímica de lesão de paciente com suspeita de LC, apresentando diversas amastigotas (A) e antígenos fragmentados (B) em evidência no campo (seta). (Aumento 1000x).	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC, de acordo com o gênero.	42
Gráfico 2 - Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC participantes do estudo, de acordo com a faixa etária.	43
Gráfico 3 - Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC, de acordo com a residência.	43
Gráfico 4 - Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC, de acordo com a localização das lesões.	44
Gráfico 5 - Tempo de surgimento das lesões dos 78 pacientes com suspeita de LC.	44
Gráfico 6 - Resumo dos resultados dos testes realizados (n=73).	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação do resultado do <i>press imprint smear</i> com o resultado do exame histológico de 78 pacientes com suspeita de LC.	46
Tabela 2 - Comparação do resultado do exame histológico com o resultado da técnica de imuno-histoquímica (n=73).	47
Tabela 3 - Comparação do resultado do <i>press imprint smear</i> com o resultado da técnica de imuno-histoquímica (n=73).	48
Tabela 4 - Resumo dos resultados encontrados para os testes realizados (n=73).	50
Tabela 5 - Comparação dos resultados encontrados para os testes realizados (n=73). IHQ: Imuno-histoquímica, <i>PIS: Press Imprint Smear</i> , H: Histológico.	51
Tabela 6 - Sensibilidade dos testes realizados, utilizando como padrão-ouro a imuno-histoquímica	51
Tabela 7 - Valor preditivo positivo e negativo dos testes realizados.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
DAB	3, 3'-diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IHQ	Imuno-histoquímica
kDNA	DNA mitocondrial
LC	Leishmaniose cutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
MS	Ministério da Saúde
NNN	Neal, Novy, Nicolle
PA	Para análise
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Sinam	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
UFC	Universidade Federal do Ceará
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WHO/OMS	World Health Organization/Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Leishmanioses.....	16
1.2 Leishmaniose Cutânea.....	16
<i>1.2.1 Epidemiologia.....</i>	<i>16</i>
<i>1.2.2 Agente etiológico.....</i>	<i>20</i>
<i>1.2.3 Vetor.....</i>	<i>21</i>
<i>1.2.4 Transmissão.....</i>	<i>23</i>
<i>1.2.5 Manifestações clínicas.....</i>	<i>24</i>
1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	27
<i>1.3.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2 Diagnóstico laboratorial.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2.1 Exames parasitológicos.....</i>	<i>28</i>
<i>1.3.2.2 Exames moleculares - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....</i>	<i>32</i>
<i>1.3.2.3 Exames imunológicos.....</i>	<i>33</i>
1.4 Justificativa.....	34
2 OBJETIVOS.....	35
2.1 Objetivo geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
3 METODOLOGIA.....	36
3.1 Delineamento do estudo.....	36
3.2 População de estudo.....	36
3.3 Coleta das amostras.....	36
3.4 Exames laboratoriais.....	37
<i>3.4.1 Press imprint smear.....</i>	<i>37</i>
<i>3.4.2 Histologia.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4.3 Imuno-histoquímica.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4.3.1 Padronização da técnica.....</i>	<i>38</i>
<i>3.4.3.2 Imuno-histoquímica.....</i>	<i>39</i>
<i>3.4.4 Critério de análise dos resultados.....</i>	<i>40</i>
<i>3.4.5 Considerações Éticas.....</i>	<i>41</i>
4 RESULTADOS	42

4.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos.....	42
4.2 Resultado dos exames.....	45
<i>4.2.1 Press imprint smear.....</i>	45
<i>4.2.2 Exame histológico.....</i>	45
<i>4.2.3 Imuno-histoquímica.....</i>	47
<i>4.2.4 Comparação entre os testes realizados.....</i>	50
<i>4.2.4.1 Resumo dos resultados.....</i>	50
<i>4.2.4.2 Sensibilidade.....</i>	51
<i>4.2.4.3 Valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN)....</i>	51
5 DISCUSSÃO.....	52
6 CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
APÊNDICES	
A- TABELA COM DADOS CLÍNICO -EPIDEMIOLÓGICOS DOS..... PARTICIPANTES DO ESTUDO	74
B- TABELA COM OS DADOS LABORATORIAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	77
ANEXOS	
A- MACRORREGIÕES DO ESTADO DO CEARÁ.....	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas que constituem uma das seis doenças mais importantes no mundo para a Organização Mundial da Saúde (DESJEUX, 2001). É endêmica em 98 países ou territórios, com uma estimativa de cerca de 1,3 milhões de casos novos por ano, dos quais apenas 600.000 são realmente notificados (WHO, 2013).

A doença é causada por diversas espécies do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), classificadas na ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (LAINSON & SHAW, 1987). Os protozoários são transmitidos aos mamíferos por fêmeas de flebotomíneos, consistindo em uma infecção zoonótica, afetando diversas espécies além do homem, que pode ser envolvido no ciclo em um momento secundário (LESSA *et al.*, 2007). Aproximadamente 21 espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, este último presente apenas nas Américas, podem infectar o homem, dando lugar a uma ampla variedade de quadros clínicos. Esta variação vai desde infecções assintomáticas até um amplo espectro de manifestações clínicas com acometimento da pele, mucosas e/ou órgãos internos (LAINSON & SHAW, 1998).

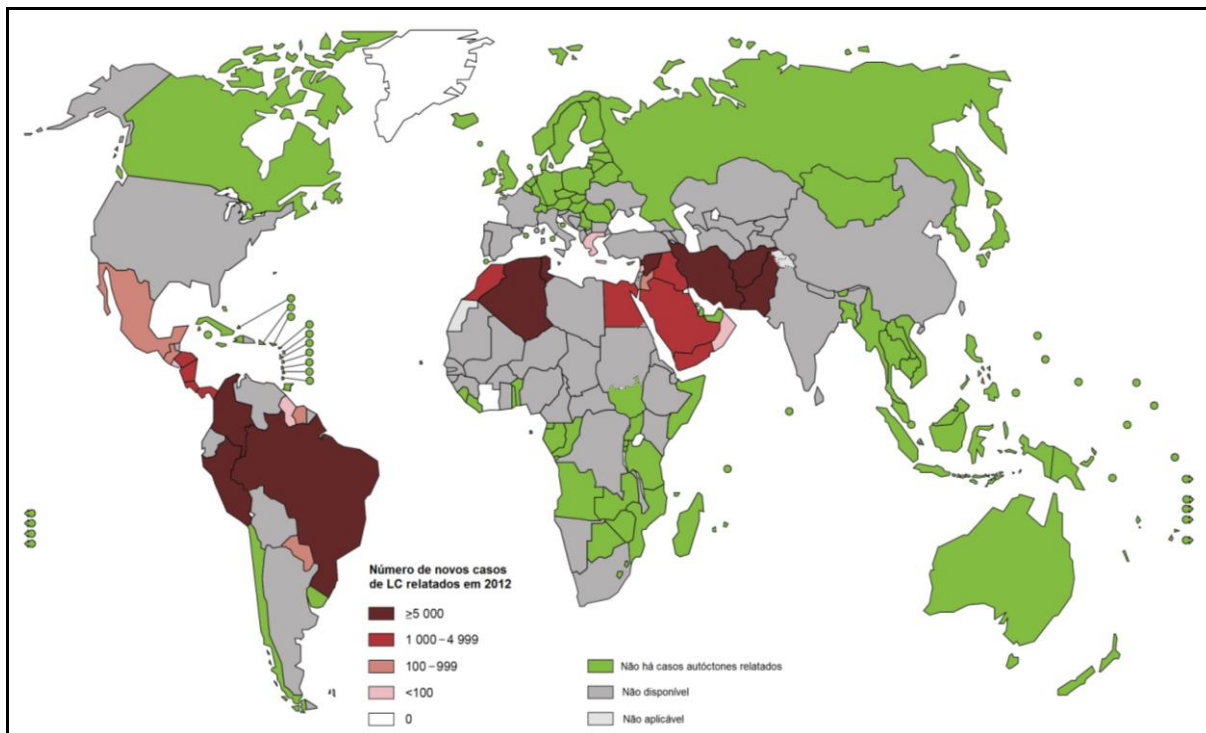
A leishmaniose cutânea (LC) é dividida em quatro grupos com diferentes fenótipos clínicos: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose mucosa (BAILEY & LOCKWOOD, 2007; NYLÉN & EIDSMO, 2012).

1.2 Leishmaniose Cutânea

1.2.1 Epidemiologia

A LC é a forma mais comum da leishmaniose, com 1 milhão de novos casos por ano, ocorrendo principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria e Tunísia (WHO, 2013) (Figura 1).

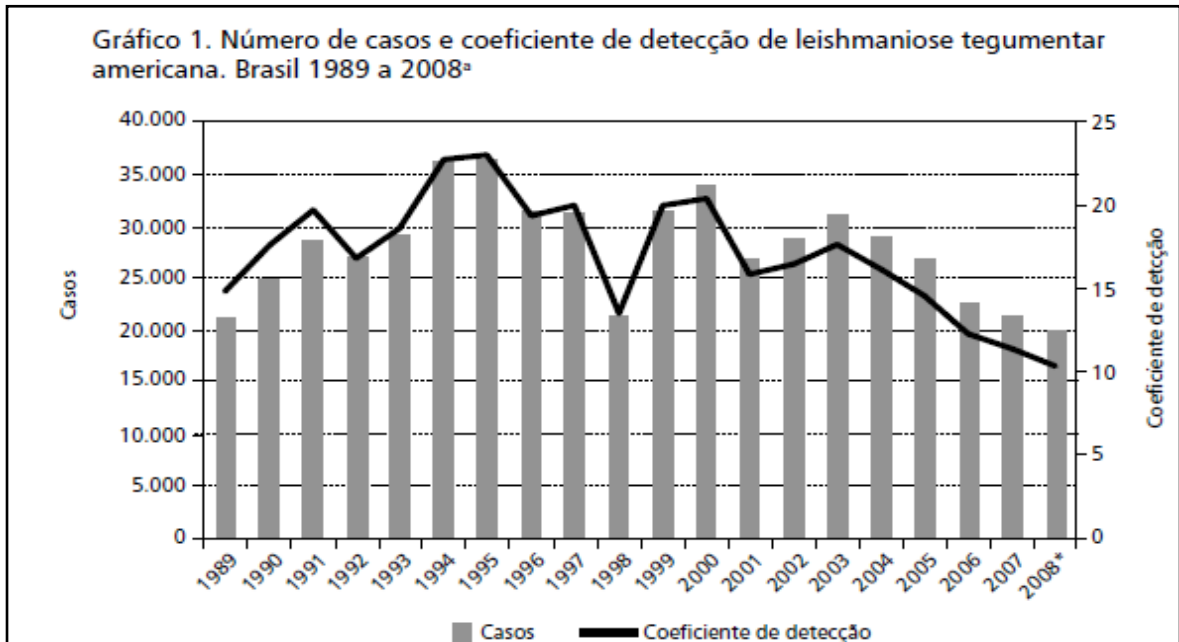
Figura 1. Número de novos casos relatados de leishmaniose cutânea (LC) no mundo em 2012.



Fonte: WHO, 2013.

No Brasil, durante o período de 1988 a 2007, a LC apresentou média anual de 27.736 casos autóctones registrados e coeficiente de detecção médio de 17,3 casos por 100.000 habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência no crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100.000 habitantes, respectivamente. Observa-se uma expansão geográfica da doença no país, onde no início da década de 80 foram registrados casos autóctones em 19 unidades federadas e, no ano de 2003, foi confirmada autoctonia em todas as unidades federadas do país. A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos (cerca de 36,0% do total de casos registrados, no período) e com os coeficientes médios mais elevados (85,4 casos por 100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (43,5 casos por 100.000 habitantes) e Centro-oeste (37,5 casos por 100.000 habitantes) (BRASIL, 2010) (Figura 2).

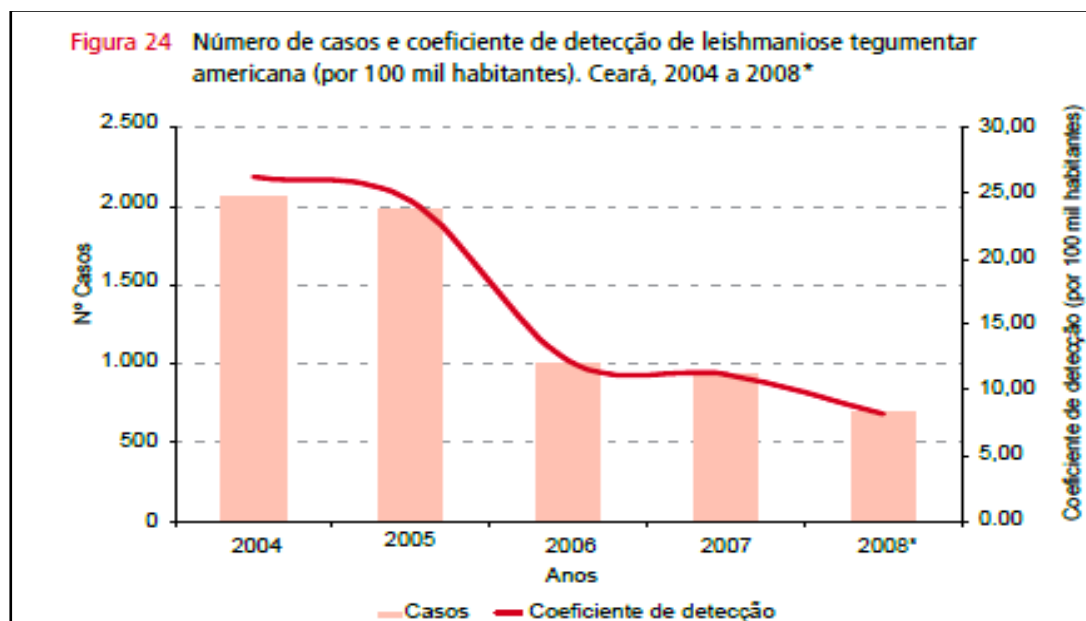
Figura 2. Gráfico do número de casos e coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, de 1989 a 2008.



Fonte: SVS/MS, 2009.

No período de 2004 a 2008, foram registrados 6.672 casos de LC no Ceará, o que corresponde a 20% da ocorrência na Região Nordeste e 6% no país. O Ceará está classificado entre os dez estados com maior registro de casos, onde o coeficiente médio de detecção para o período foi de 16,5 casos por 100 mil habitantes (BRASIL, 2009) (Gráfico 2). No ano de 2009, foram registrados 993 casos, com um coeficiente de detecção de 11,6 casos por 100.000 habitantes. Do total, 86,7% ocorreram em maiores de 10 anos e 51,3% eram do sexo masculino (BRASIL, 2011).

Figura 3. Gráfico do número de casos e coeficiente de detecção de leishmaniose tegumentar americana (por 100 mil habitantes) no Ceará, de 2004 a 2008.



Fonte: Sinan/SVS/MS, 2009.

Em Fortaleza, no período de 2001 a 2005, foram registrados uma média de 29 casos por ano com maior frequência nos meses de novembro e dezembro totalizando 143 casos. No entanto, não há referência se esses casos são autóctones ou importados de outros municípios (BRASIL, 2006) (Figura 4).

Figura 4. Tabela do número de casos de leishmaniose tegumentar registrados em Fortaleza, de 2001 a 2005.

Tabela 4.2 – Número de casos de leishmaniose tegumentar registrados em Fortaleza, 2001-2005													
Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Tot
2001	1	1	0	1	2	2	4	7	8	14	24	19	83
2002	3	6	7	2	0	0	1	2	1	0	0	1	23
2003	1	2	0	0	2	0	0	1	0	0	2	0	8
2004	3	1	0	1	2	0	2	5	4	1	1	0	20
2005	1	0	1	1	0	0	2	0	0	1	2	1	9
Total	9	10	8	5	6	2	9	15	13	16	29	21	143

Fonte: SMS/Célula de Vigilância Epidemiológica, 2006.

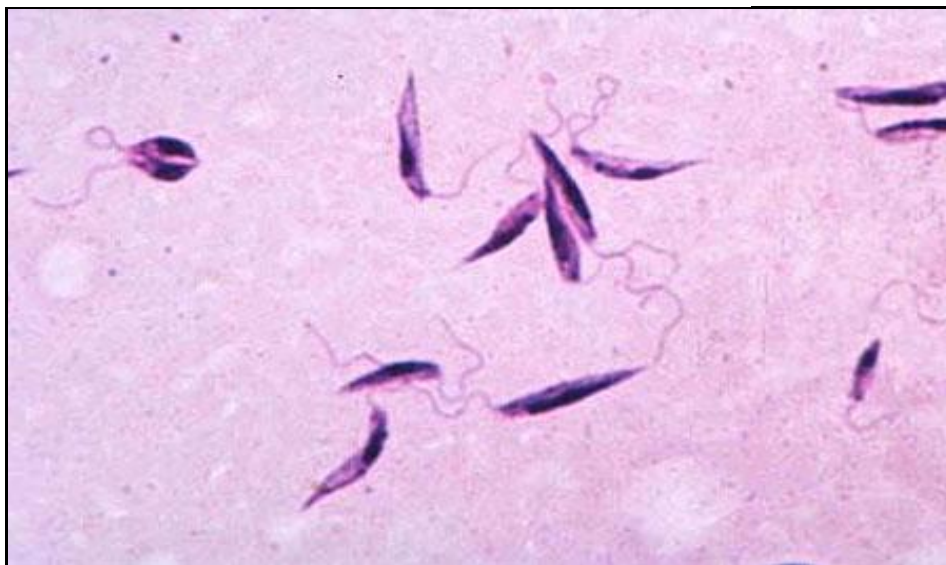
1.2.2 Agente etiológico

No continente americano, são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* dermatrópica causadoras de doença em seres humanos (COSTA *et al.*, 2007). No Brasil, sete espécies foram associadas à LC: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (LAINSON E SHAW, 1987). A grande maioria das lesões cutâneas encontradas no Brasil é causada por *L. (V.) braziliensis* (LAINSON, 1983; LLANOS-CUENTAS *et al.*, 1984; GRIMALDI & TESH, 1993; GOMES *et al.*, 2008).

As leishmanias, de ciclo heteroxênico, são parasitos intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear e acometem órgãos como medula óssea, baço, fígado, pele e linfonodos. Possuem dois estágios evolutivos de acordo com o hospedeiro vertebrado ou invertebrado: amastigota e promastigota, respectivamente (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

- a) Forma promastigota: encontrada no hospedeiro invertebrado, onde o parasito apresenta uma forma flagelada móvel, com aproximadamente 15-26µm de comprimento, com cinetoplasto localizado na extremidade do flagelo e com núcleo centralizado. A promastigota vive no meio extracelular, na luz do trato digestivo do flebotomíneo, podendo crescer em temperatura ambiente, variando de 22°C a 26°C (PEARSON & SOUSA, 1996; CUNNINGHAM, 2002) (Figura 5).
- b) Forma amastigota: encontrada no hospedeiro vertebrado, onde se multiplica dentro do fagolisossomo de células do sistema fagocítico mononuclear. Apresenta forma esférica ou ovalada, imóvel e com tamanho aproximado de 2,5µm de diâmetro. Junto à bolsa flagelar encontra-se uma estrutura denominada cinetoplasto, rica em DNA mitocondrial, o kDNA. As formas amastigotas estão adaptadas para resistirem à temperatura do corpo dos mamíferos (PEARSON & SOUSA, 1996) (Figura 6).

Figura 5 - Formas promastigotas de *Leishmania*.



Fonte: Fiocruz.

Figura 6 - Formas amastigotas de *Leishmania*

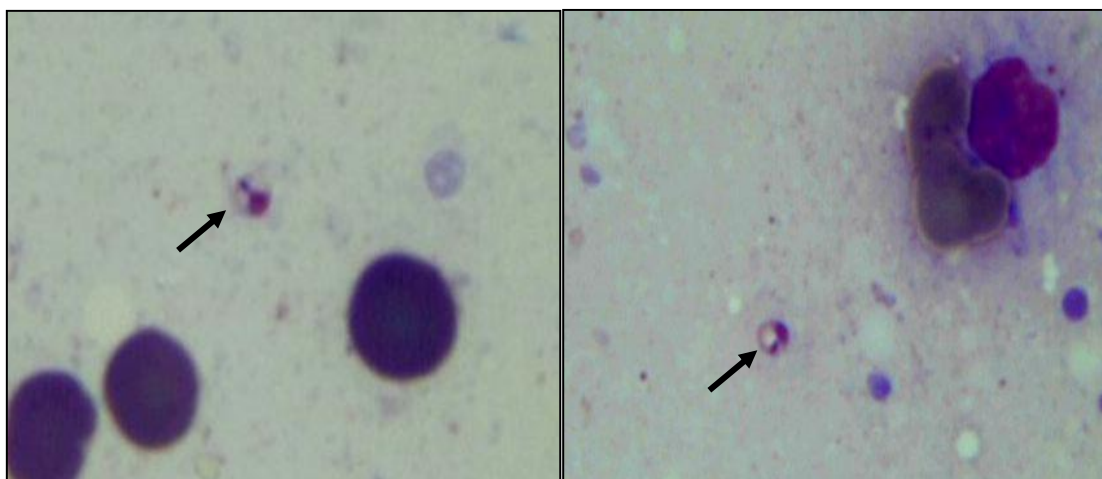


Foto: Dr. Anastácio de Queiroz Sousa

1.2.3 Vetor

Os vetores da LC são insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira ou birigui, pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae* (GOTO & LINDOSO, 2010). As principais espécies envolvidas na transmissão da leishmaniose tegumentar americana são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*, sendo o *L. whitmani* o principal vetor responsável pela transmissão no Ceará (BASANO *et al.*, 2004) (Figura 7).

Figura 7 – Fêmea de flebotomíneo *Lutzomia longipalpis* se alimentando.



Fonte: Bird & Wildlife Photography – Ray Wilson

Os flebotomíneos são dípteros hematófagos de aproximadamente 2-3mm, apresentando pernas longas e delgadas, com o corpo densamente piloso de coloração castanha clara ou cor-de-palha. Tem como características o voo saltitante ou contínuo com pequeno raio de dispersão, em torno de 200 metros e a manutenção das asas eretas, mesmo em repouso. Apenas as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para picar e sugar o sangue. Possuem atividade noturna, diminuindo a intensidade do ataque no meio da noite e voltando a atacar perto do nascer do sol. Entretanto, algumas vezes, os flebotomínios podem se mostrar ativos mesmo durante o dia, principalmente em lugares sombrios e úmidos (REBÊLO, 2001).

Em quase todas as espécies, as fêmeas precisam de uma refeição de sangue (repasto sanguíneo) para o desenvolvimento de seus ovos. Já os machos são vistos ocasionalmente com sangue no estômago, mas, como suas peças bucais são muito mal desenvolvidas para provocar lesões na pele, presume-se que o sangue tenha sido retirado de alguma ferida da pele, não desempenhando qualquer papel na transmissão das leishmanioses (WHO, 2010).

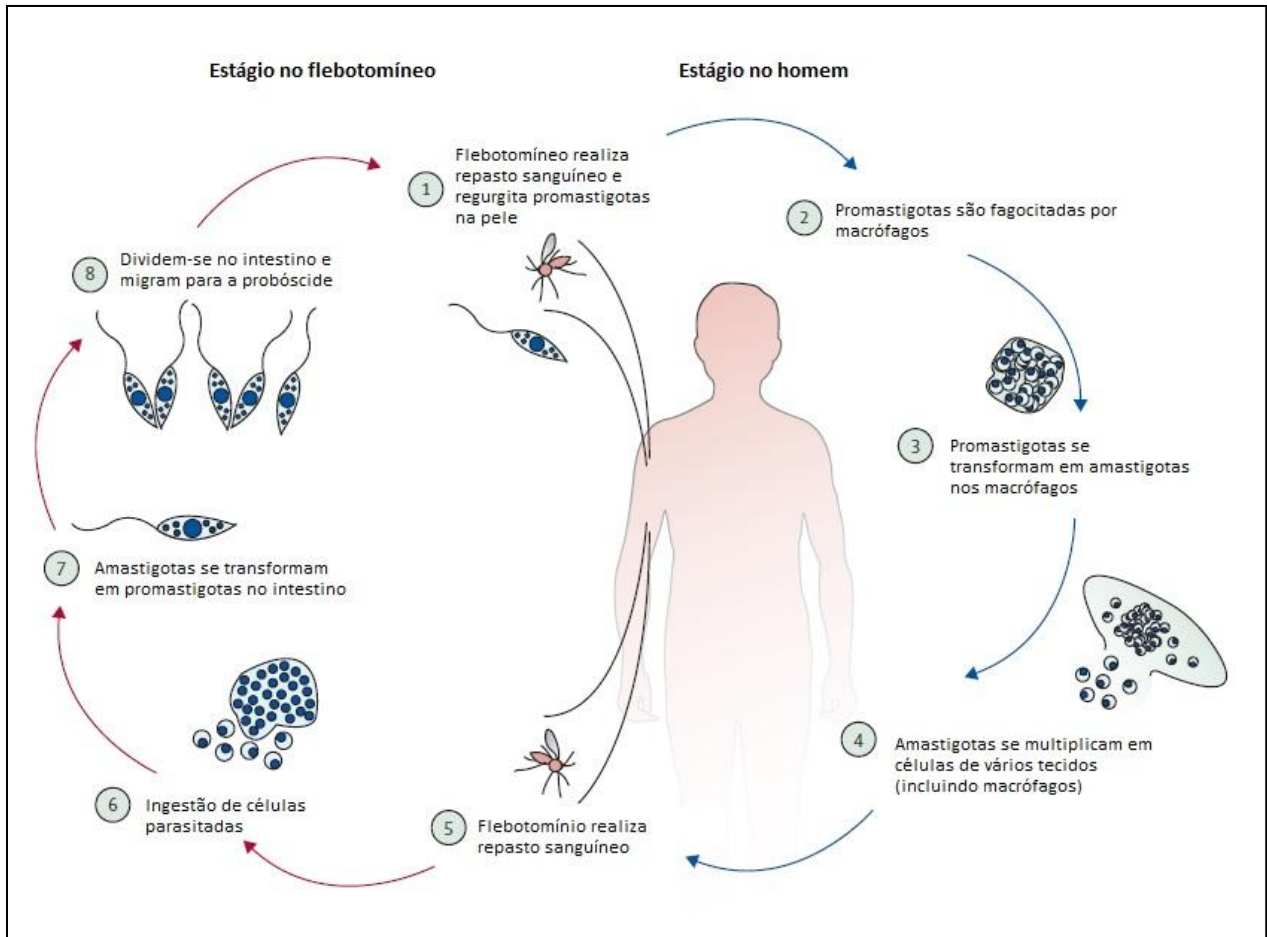
1.2.4 Transmissão

A transmissão vetorial é o modo mais comum de transmissão, entretanto outros modos de transmissão mais raros, como parenteral, congênita e ocupacional (picada se agulha) podem ocorrer (ASHFORD & BATES, 1998; HERWALDT, 1999).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto ingere formas amastigotas de *Leishmania* que se transformam em promastigotas e migram para as partes anteriores do tubo digestivo do inseto, atingindo o aparelho sugador, probóscida. No momento em que o flebotomíneo infectado realiza novo repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado, as promastigotas são libertadas e depositadas no local da picada ou injetado, juntamente com vasodilatadores potentes (como o maxadilán) que produzem um eritema duradouro (LERNER *et al.*, 1991; ASHFORD, 2000; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). Os macrófagos do hospedeiro vertebrado fagocitam as promastigotas, as quais se transformam em amastigotas dentro do fagolisossomo, onde se multiplicam por divisão binária e finalmente provocam a lise das células hospedeiras e infecção dos macrófagos adjacentes. O ciclo se fecha quando outro flebotomíneo faz um novo repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, levando a infecção para outro mamífero vertebrado (MURRAY *et al.*, 2005; SINGH, 2006) (Figura 8).

A LC constitui uma zoonose de animais silvestres e mais raramente domésticos, incluindo marsupiais, desdentados, carnívoros e mesmo primatas (GONTIJO & CARVALHO, 2003). *Leishmania (V.) braziliensis* foi detectada em vários roedores selvagens dos gêneros *Akodon*, *Proechimys*, *Rattus*, *Oryzomys*, *Rhipidomys*, *Nectomys*, *Necromys* e marsupiais do gênero *Didelphis* (LAINSON & SHAW, 1969; FORATTINI, *et al.*, 1972; FORATTINI, *et al.*, 1973; LAINSON & SHAW, 1973; LAINSON *et al.*, 1981; BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 1994). Embora evidências sorológicas e/ou moleculares do parasito em cães domésticos provenientes de áreas endêmicas de LC tenham sido relatadas, mais pesquisas são necessárias para determinar o papel destes animais na cadeia de transmissão do parasito (BRANDÃO-FILHO *et al.*, 1994; DANTAS-TORRES *et al.*, 2010).

Figura 8 - Ciclo biológico da Leishmaniose.



Fonte: REITHINGER *et al.*, 2007 (adaptado).

1.2.5 Manifestações clínicas

O período de incubação da forma cutânea pode variar de 10 dias a três meses, como uma pápula eritematosa que progride lentamente para nódulo. A LC pode apresentar diversas formas de manifestação clínica, desde lesões cutâneas auto-limitadas a formas mucocutâneas desfigurantes, tornando o diagnóstico clínico difícil. Esta variação de sintomas está relacionada ao estado imunológico do paciente e às espécies de *Leishmania* envolvidas, que possuem grande variabilidade (SARAVIA *et al.*, 1989; CUPOLILLO *et al.*, 2003; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A forma cutânea localizada é definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das promastigotas infectantes por meio da picada do vetor. A lesão primária é geralmente única, embora eventualmente múltiplas picadas do

flebotomíneo ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões. São frequentes as ulcerações com bordas elevadas, endurecidas e fundo com tecido granulomatoso grosseiro, configurando a clássica lesão com borda em moldura. O quadro é normalmente assintomático, predominando nas áreas corpóreas descobertas e se instala em pacientes de áreas endêmicas ou que lá estiveram recentemente. Pode ter decurso abortivo ou assumir caráter tórpido, terminando em regressão espontânea, conforme observado em vários focos brasileiros. Na maioria dos casos a infecção progride e, após um período de latência clínica de vários meses de duração, surgem as lesões cutâneas e/ou mucosas, consequentes à disseminação hematogênica e/ou linfática do parasito (MARZOCHI, 1992; DESJEUX, 2004) (Figura 9).

A forma mucosa é condição de difícil tratamento e prognóstico reservado quanto à possibilidade de cura. Na maioria dos casos está associada à *L. braziliensis* (AMATO *et al.*, 2008), embora *L. amazonensis* (COSTA *et al.*, 1986) e *L. guyanensis* (GUERRA *et al.*, 2011) também sejam espécies implicadas nessa forma clínica, ocorrendo em um intervalo de tempo variável após a instalação da lesão cutânea inicial. Os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para essa forma tardia não são de todo conhecidos, mas sabe-se que a demora na cicatrização da lesão primária e tratamento inicial inadequado podem estar associados (MARSDEN, 1986; CARVALHO *et al.*, 1995). O acometimento mucoso pode surgir com a lesão cutânea ainda em atividade ou anos após sua cicatrização. A doença normalmente inicia-se com inflamação e congestão nasal, seguido por ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo, seguindo-se com o envolvimento da mucosa oral em alguns casos. De todo modo, o risco de deformidades permanentes é considerável (GREVELINK, 1996; PEARSON & SOUSA, 1996). O acometimento de outras mucosas que não as das vias aéreas superiores é excepcional (MARSDEN, 1986) (Figura 10).

A forma cutânea difusa, causada no Brasil pela *L. amazonensis*, caracteriza-se por lesões nodulares não-ulceradas. Esta forma está associada a uma resposta imune anérgica, com proliferação e disseminação do parasito por todo tegumento. Levando-se em conta que a leishmaniose cutânea é uma doença espectral, com um polo anérgico, representado pela leishmaniose difusa, em oposição à forma polar representada pela leishmaniose mucosa (CONVIT *et al.*, 1993). Suas lesões nodulares e infiltrações cutâneas pronunciadas simulam quadro de hanseníase virchowiana. As lesões, via de regra, não regridem espontaneamente e são classicamente refratárias ao tratamento medicamentoso (PEARSON & SOUSA, 1996; GREVELINK, 1996). (Figura 11).

A forma cutânea disseminada é caracterizada por lesões múltiplas, geralmente ulceradas, distribuídas por diversas áreas do tegumento, distantes do sítio de inoculação primária, resultantes da disseminação hematogênica ou linfática. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta forma de leishmaniose são *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994, VIEIRA *et al.*, 2002). Em casos de evolução tardia ou quando os pacientes não são tratados, podem ocorrer lesões simultâneas na pele e nas mucosas. Na histologia, observam-se raros histiócitos e parasitos. A resposta imune celular está preservada, porém, é incapaz de controlar a infecção (CARVALHO *et al.*, 1994; SILVEIRA *et al.*, 2004) (Figura 12).

Figura 9. Forma cutânea



Foto: Dr. Anastácio de Queiroz Sousa

Figura 10. Forma mucosa.

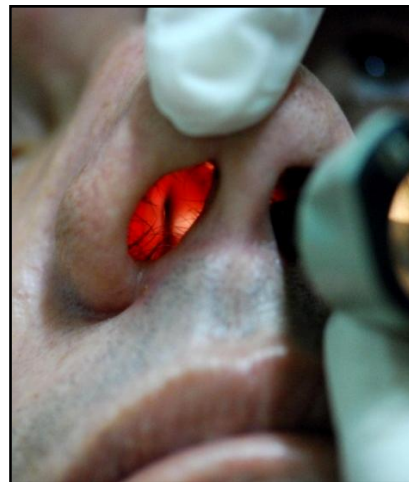


Foto: Dr. Anastácio de Queiroz Sousa

Figura 11. Forma cutânea difusa.



Foto: Dra. Aldina Barral

Figura 12. Forma cutânea disseminada.



Foto: Dr. Anastácio de Queiroz Sousa

1.3 Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

1.3.1 Diagnóstico clínico-epidemiológico

O diagnóstico clínico da LC pode ser feito com base nas características da lesão associadas à anamnese, onde os dados epidemiológicos são de grande importância, especialmente se o paciente procede de áreas endêmicas ou esteve presente em lugares onde há casos de leishmaniose. As formas tegumentares do Novo Mundo compreendem uma síndrome cujas manifestações clínicas dependem de alguns fatores, como a espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasito com seu hospedeiro. A LC produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato (SARAVIA *et al.*, 1989). Assim, a confirmação do diagnóstico pela observação do parasito é fundamental, tendo em vista o número de doenças que, clinicamente, podem se assemelhar à LC, tais como esporotricose, blastomicose, hanseníase, neoplasias (GOTO & LINDOSO, 2010).

De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2010), a definição de caso de leishmaniose cutânea dá-se quando o indivíduo apresenta úlcera cutânea, com fundo granuloso e bordas infiltradas em moldura. A confirmação do caso ocorre quando o indivíduo com suspeita clínica apresenta um dos seguintes critérios:

- a) Residência, procedência ou deslocamento em área com confirmação de transmissão, associado ao encontro do parasita nos exames parasitológicos;
- b) Residência, procedência ou deslocamento em área com confirmação de transmissão, associado à intradermoreação de Montenegro (IDRM) positiva;
- c) Residência, procedência ou deslocamento em área com confirmação de transmissão, sem associação a outro critério, quando não há acesso a métodos de diagnóstico.

1.3.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico da LC é geralmente realizado com base em dados clínicos e epidemiológicos em associação a algum teste laboratorial. Várias técnicas diagnósticas estão disponíveis, entretanto não existe um teste único que seja seguro isoladamente (SALMAN *et*

al., 1999). O diagnóstico de certeza de um processo infeccioso é feito pelo encontro do parasito, ou de seus produtos, nos tecidos ou fluidos biológicos dos hospedeiros. Portanto, recomenda-se a confirmação do diagnóstico por método parasitológico, antes do início do tratamento, especialmente naqueles casos com evolução clínica fora do habitual e/ou má resposta a tratamento anterior. O diagnóstico laboratorial da leishmaniose constitui-se fundamentalmente de três grupos de exames: exames parasitológicos, exames imunológicos e exames moleculares (SINGH, 2006).

1.3.2.1 Exames parasitológicos

O diagnóstico de certeza somente se obtém pela demonstração do parasito, que pode ser obtida através de diferentes técnicas parasitológicas de pesquisa direta e indireta.

a) Exame direto

O exame direto é o teste de primeira escolha na rotina laboratorial, devido ao baixo custo, pela facilidade e rapidez de execução, por não necessitar de equipamentos sofisticados de laboratório e poder ser realizado mesmo em unidades de saúde sem muita infraestrutura. Consiste na pesquisa direta em microscopia óptica das formas amastigotas do parasito na amostra do paciente, onde o material pode ser obtido por diversas formas, como por escarificação, aspiração ou biópsia da borda, corado por Giemsa ou Leishman (RAMIREZ *et al.*, 2000; SINGH, 2006; HASHEMI *et al.*, 2011).

Apesar de serem procedimentos rápidos, de baixo custo e de fácil execução, apresentam baixa sensibilidade, em virtude do pequeno número de parasitos encontrados em algumas lesões de pele e da necessidade de grande habilidade profissional na identificação das formas amastigotas dos parasitos por microscopia ótica (ASHFORD, 2000; GOTO & LINDOSO, 2010). Além disso, a chance de se encontrar o parasito é inversamente proporcional ao tempo de duração da lesão, onde a sensibilidade do método nos casos produzidos por *L. braziliensis* está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (FURTADO, 1980; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

— Histopatologia

O quadro histológico da LC varia desde um infiltrado inflamatório de células mononucleares com neutrófilos de permeio, inespecífico, discreto, moderado a acentuado, até reações granulomatosas com ou sem necrose, sem, no entanto, representar o estágio evolutivo da lesão. Além disso, não pode ser correlacionado, segundo alguns autores, com o prognóstico e nem com a resposta terapêutica (BITTENCOURT E BARRAL, 1991). Tais variações dependem da virulência da cepa do parasito, do tamanho do inóculo inicial e do perfil imunológico do indivíduo (MEHREGAN *et al.*, 1999).

Os achados histológicos são inespecíficos, e estão correlacionados com a apresentação clínica, sendo que nas lesões agudas o principal sítio da reação é a derme. Nesta região ocorre basicamente um infiltrado inflamatório mononuclear misto, intenso e difuso, composto predominantemente de macrófagos com uma mistura de linfócitos e células gigantes multinucleadas, que se estende além da área de ulceração. Também são observadas áreas de necrose na epiderme, na derme e na parede vascular, com vasculite, que parecem resultar de uma reação do tipo antígeno-anticorpo com excesso de antígenos. Amastigotas dentro de macrófagos podem ser vistas principalmente nas papilas dérmicas e próximo às áreas de necrose. Podem ser visualizadas plasmócitos e, raramente, pequena quantidade de neutrófilos e eosinófilos (MAGALHÃES *et al.*, 1986; MEHREGAN *et al.*, 1999). Nas lesões recentes, é descrito presença de granulomas imaturos. Com a evolução, podem surgir granulomas maduros. Mais tardiamente, ocorre regressão do infiltrado celular, surgindo fibrose, com redução do número de parasitas. Os anexos cutâneos sofrem hipotrofia ou atrofia, com alterações epidérmicas constituídas de acantose e papilomatose, conhecida como hiperplasia pseudo-epiteliomatosa (WEIGLE & SARAIVA, 1996; NYLEN & EIDSMO, 2012; ALVES *et al.*, 2013).

O exame histológico pode ser útil no diagnóstico diferencial da LC com doenças que se assemelham clinicamente a essa doença, como a paracoccidioidomicose, hanseníase e neoplasias. Além disso, o estudo histológico das lesões cutâneas é relevante para fornecer dados que, associados aos dados clínicos e epidemiológicos, podem sugerir o diagnóstico de leishmaniose (MEHREGAN *et al.*, 1999; D'ÁVILA *et al.*, 2004). Entretanto, a positividade em biópsias coradas por Hematoxilina-Eosina tem mostrado resultados variados, desde 20,4% a 63,7% em estudos realizados no Brasil (MAGALHÃES *et al.*, 1986; FERNANDES *et al.*, 2004; NAME *et al.*, 2005; GARCIA, 2005). Em outros países essa variação de positividade

aparece ainda mais variável, com valores desde 14,1% (WEIGLE *et al.*, 1987), 18% (NAVIN *et al.*, 1990), 20% (SOTTO, *et al.*, 1989), 40% (GUTIERREZ, *et al.*, 1991), 42% (KENNER *et al.*, 1999) até 68.5% (ANDRADE *et al.*, 2005) e pode ser ainda menor em casos de leishmaniose mucosa (SINGH & SIVAKUMAR, 2003).

— *Imprint* convencional

O *imprint* é um exame que se destaca pela sua execução simples e rápida. A técnica de *imprint* consiste em pressionar levemente o fragmento da lesão sobre a superfície de uma lâmina de vidro lisa. Dessa forma, as células mais externas da lesão ficam impressas na superfície da lâmina, podendo ser coradas e observadas ao microscópio (CAPUTO, 2008; GAZOZAI *et al.*, 2010).

. O Ministério da Saúde orienta que a demonstração do parasita em secções histopatológicas requer pesquisa adicional em amostras de *imprint* do material de biópsia. Nesse tipo de amostra, os elementos parasitários apresentam-se frequentemente alongados e parecem ser maiores em relação às imagens observadas em secções histopatológicas (BRASIL, 2006). Entretanto, há limitações quanto aos resultados encontrados por meio dessa técnica, especialmente em lesões mais antigas e úlceras com áreas de fibrose (GAZOZAI *et al.*, 2010).

A sensibilidade da técnica varia grandemente dependendo de vários fatores, entre os quais a carga parasitária, lesão tempo de evolução, local onde parasita é investigada, a qualidade do material coletado e da experiência do responsável técnico. A positividade tem apresentado resultados variados, desde 36,6% (BARI *et al.*, 2010) a 54,3% (GAZOZAI *et al.*, 2010).

— *Press Imprint smear*

A técnica do *press imprint smear* é uma forma alternativa ao *imprint* convencional, consistindo em esmagar o fragmento de biópsia entre duas lâminas de vidro sob pressão, gerando um extrato rico em células sobre a lâmina, aumentando a superfície de análise.

Após o desenvolvimento da técnica do *press imprint smear*, foi observada a existência de outra técnica parecida já utilizada na área de veterinária. Denominada “*squash preparation*”, a técnica é utilizada no diagnóstico de células tumorais do sistema nervoso (SHAH *et al.*, 1998; DE LORENZI *et al.*, 2006; MITRA *et al.*, 2010).

b) Cultivo do parasito “*in vitro*”

O meio mais empregado para isolamento é o ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle – NNN, enriquecido com meio de Schneider e mantido à temperatura ambiente (24-26 °C). O crescimento ocorre em torno de uma a duas semanas e formas promastigotas poderão ser visualizadas ao microscópio óptico. Entretanto, as culturas só devem ser descartadas como negativas após quatro semanas da data da inoculação (GREVELINK & LERNER, 1996; SALMAN *et al.*, 1999).

A positividade da técnica é bastante variável, apresentando valores distintos na literatura: 20% (BERMAN, 1997), 35,8% (PASSOS *et al.*, 1999), 38% (NAVIN *et al.*, 1990), 49,4% (WEIGLE *et al.*, 1987) até 50,7% (POURMOHAMMADI *et al.*, 2010). Esta variação depende de diversos fatores: a forma clínica da doença, o tempo de evolução, o uso prévio de tratamento específico, a qualidade dos reagentes e meios de cultura, a contaminação da amostra por fungos e bactérias e a habilidade técnica do profissional envolvido, tanto na coleta como no manuseio da cultura (RODRÍGUEZ *et al.*, 1994; ROMERO *et al.*, 1999; RAMOS-E-SILVA & JACQUES, 2002). O longo período de acompanhamento do crescimento das formas promastigotas e a ocorrência de contaminação são limitações do teste. PIRMEZ *et al.* (1999) descrevem uma taxa de contaminação de 19% em culturas de biópsias de lesões cutâneas e de 46% em culturas de material de lesões mucosas.

c) Cultivo do parasito “*in vivo*”

Outro método de isolamento de *Leishmania* para confirmação diagnóstica é a inoculação de aspirado ou fragmento de biópsia em animais de laboratório, tendo o *Mesocricetus auratus* (hamster) como primeira escolha. O material obtido é macerado e diluído em solução salina estéril, sendo posteriormente homogeneizado e injetado, preferencialmente, nas patas posteriores do animal (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

Além do tempo necessário para a evolução da lesão no animal, a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (GONTIJO & CARVALHO, 2003). A positividade pode variar de 38,3% a 52,4% (WEIGLE *et al.*, 1987), mas o tempo de crescimento do parasito é lento, dificultando a utilização deste método para diagnóstico, sendo utilizado com mais frequência para pesquisa. O resultado só poderá ser avaliado após um período de um mês, quando as lesões começam a surgir no animal inoculado (SALMAN *et al.*, 1999).

1.3.2.2 Exames moleculares - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Uma variedade de técnicas moleculares tem sido desenvolvidas para o diagnóstico da leishmaniose (REITHINGER & DUJARDIN, 2007). Uma abordagem molecular, baseada na detecção de DNA de *Leishmania*, apresenta dois objetivos: detecção do parasito e identificação das espécies de *Leishmania*, que não é atingida por outros métodos, exceto quando são analisadas promastigotas cultivadas, utilizando anticorpos monoclonais específicos para detecção de espécies em imuno-histoquímica e imunofluorescência (CUPOLILLO *et al.*, 1995; GRIMALDI & MCMAHON-PRATT, 1996). Entre os métodos laboratoriais empregados para detectar o agente etiológico ou seus produtos, a PCR é considerada um bom método para a utilização no diagnóstico em laboratórios razoavelmente equipados. Algumas das vantagens da PCR, quando comparado a outros métodos parasitológicos, são: a possibilidade de detecção do DNA de *Leishmania* na forma de amastigota e promastigota, mesmo com uma baixa carga parasitária, a diversidade de materiais biológicos que podem ser utilizados, a especificidade encontrada e a disponibilidade rápida de resultados. 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 elevado, constituindo esta uma das desvantagens do método. Características como incapacidade de diferenciar infecção passada e atual, possibilidade de reações positivas na ausência da doença e a dificuldade de formulações de kits comerciais são outras desvantagens do método que restringem seu emprego na rotina laboratorial, sendo mais utilizada em instituições de pesquisa e universidades (GOTO & LINDOSO, 2010).

1.3.2.3 Exames imunológicos

a) Intradermorreação de Montenegro (IDRM)

O teste consiste na injeção de uma suspensão de antígeno, preparado com formas promastigotas, na face anterior do antebraço, para a indução da resposta de hipersensibilidade tardia, e a reação é lida após 48 a 72 horas. É considerado positivo quando ocorre formação de endureção com diâmetro igual ou maior a 05 mm. Este teste é útil nos inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas, porém, não distingue infecções passadas de atuais (SALMAN *et al.*, 1999).

A positividade da IDRM em paciente com LC fica em torno de 90% (GREVELINK & LERNER, 1996), outros relatos encontrados na literatura apresentam variações como de 96% (NAME *et al.*, 2005), 73,4% (GARCIA *et al.*, 2005), 100% (ANDRADE *et al.*, 2005).

b) Testes sorológicos

As técnicas sorológicas se revelaram um instrumento importantíssimo no estudo de doenças infecciosas. São baseadas na identificação de anticorpos no soro dos pacientes. Existem diferentes testes para a detecção de anticorpos anti- *Leishmania*, onde o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) são os métodos que são amplamente utilizados no diagnóstico de leishmaniose (VIDIGAL *et al.*, 2008). No entanto, na leishmaniose tegumentar a sensibilidade é considerada baixa, tornando-se um pouco maior no caso de lesões crônicas. No caso de leishmaniose mucosa (em que é difícil detectar o parasito), a sorologia positiva pode ser o único critério para diagnóstico (GOTO & LINDOSO, 2010). Além disso, devido ao fato do nível de anticorpos diminuir após o tratamento, um resultado positivo pode indicar uma infecção atual (ROMERO *et al.*, 2005).

c) Imuno-histoquímica (IHQ)

A utilização da técnica de imuno-histoquímica tem mostrado sucesso no diagnóstico de LC (WEIGLE *et al.*, 1987; SALINAS *et al.*, 1989; KENNER *et al.*, 1999; SCHUBACH *et al.*, 2001; QUINTELLA *et al.*, 2009). A detecção de amastigotas de *Leishmania* em cortes fixados por formalina tamponada e incluídos em parafina, tanto de tecidos humanos como em cães. É um exame que não necessita de equipamentos especiais e é altamente sensível (LIVNI

et al., 1983; FERRER *et al.*, 1988; BOURDOISEAU *et al.*, 1997; TAFURI *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2013).

A sensibilidade dos testes de imuno-histoquímica depende principalmente do sistema de detecção utilizado, que se baseia na mudança de cor induzida pela enzima ligada a imuno-complexos, vinculados a uma secção de tecido, depois de reagir com seu substrato e o cromógeno. O sistema de reconhecimento mais empregado das técnicas de imuno-histoquímica é o da estreptoavidina-biotina peroxidase, que se baseia na afinidade de estreptoavidina pela biotina. A biotina normalmente é ligada a um anticorpo secundário, que se liga a um complexo de estreptoavidina-peroxidase (enzima) para produzir uma reação de cor (RAMOS-VARA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2013).

Recentemente, uma nova geração de técnicas de imuno-histoquímica tem utilizado polímeros livres de biotina, que contém anticorpos secundários e enzimas, capazes de identificar a ligação do anticorpo primário aos antígenos teciduais, mesmo em baixa concentração. O uso do sistema de polímeros livres de biotina torna a imuno-histoquímica mais rápida, não produz coloração de fundo gerada pela biotina endógena e tem sensibilidade comparável ou às vezes superior aos métodos de imuno-histoquímica, que utilizam o sistema estreptoavidina-biotina (RAMOS-VARA *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2009; LUNEDO *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2013).

1.4 Justificativa

Devido ao seu amplo espectro clínico, a leishmaniose cutânea pode ser confundida com outras patologias que acometem a pele e que apresentam sinais semelhantes. Desse modo, é necessário que, além do diagnóstico clínico-epidemiológico, haja uma confirmação laboratorial da doença que auxilie no descarte de um quadro falso positivo e possibilite o tratamento adequado do paciente. Entretanto, as técnicas atuais empregadas na rotina laboratorial são, em sua maioria, laboriosas, apresentam um custo elevado e baixa sensibilidade.

Assim, é extremamente importante que novas técnicas diagnósticas, que conciliem execução rápida, baixo custo e maior sensibilidade, sejam desenvolvidas. Desse modo, a relevância do estudo consiste em propor um método diagnóstico alternativo para o diagnóstico da leishmaniose, de baixo custo e fácil execução.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o método *press imprint smear* no diagnóstico de leishmaniose cutânea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as características clínico-epidemiológicas dos participantes do estudo;
- Comparar a positividade do *press imprint smear* com o exame histológico;
- Comparar a positividade do *press imprint smear* com a imuno-histoquímica;
- Avaliar a sensibilidade das técnicas estudadas.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo transversal prospectivo para comparação de métodos diagnósticos de leishmaniose tegumentar americana.

3.2 População de estudo

Os participantes do estudo foram provenientes do Hospital São José de Doenças Infecciosas, em Fortaleza, durante os anos de 2010 a 2013, e atenderam aos seguintes critérios:

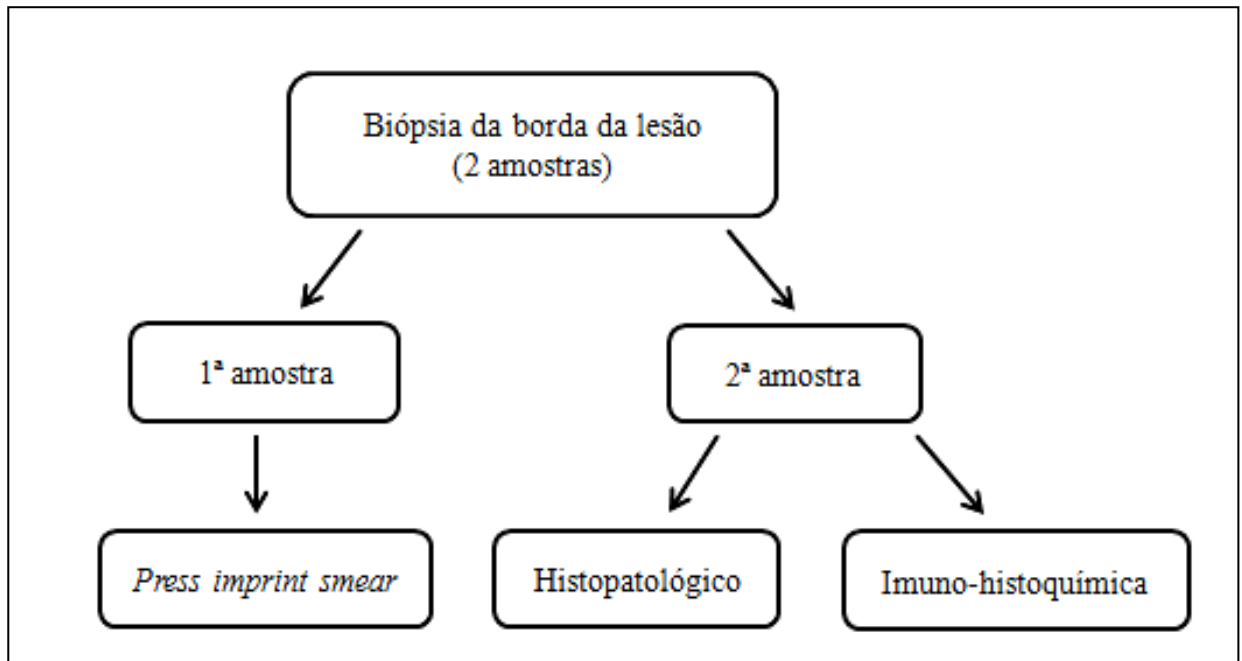
- a) Critérios de inclusão: pacientes que apresentavam hipótese clínica de leishmaniose tegumentar, que aceitaram participar do estudo e dos quais foram coletadas amostras para a realização dos exames;
- b) Critérios de exclusão: participantes que apresentaram resultado negativo em todos os exames realizados.

Os dados clínico-epidemiológicos foram coletados dos pacientes participantes do estudo para análise exploratória das variáveis: idade, sexo, número de lesões, tempo de evolução das lesões, localização das lesões e local de residência.

3.3 Coleta das amostras

Após assepsia e anestesia do local da lesão, foram coletadas duas amostras das bordas da úlcera, utilizando *punch* descartável de 2 mm. Uma amostra foi fixada em formol tamponado a 10% e processada para os preparados histológicos. A outra foi utilizada para confecção das lâminas do *press imprint smear* (Figura 13).

Figura 13. Fluxograma dos exames realizados.

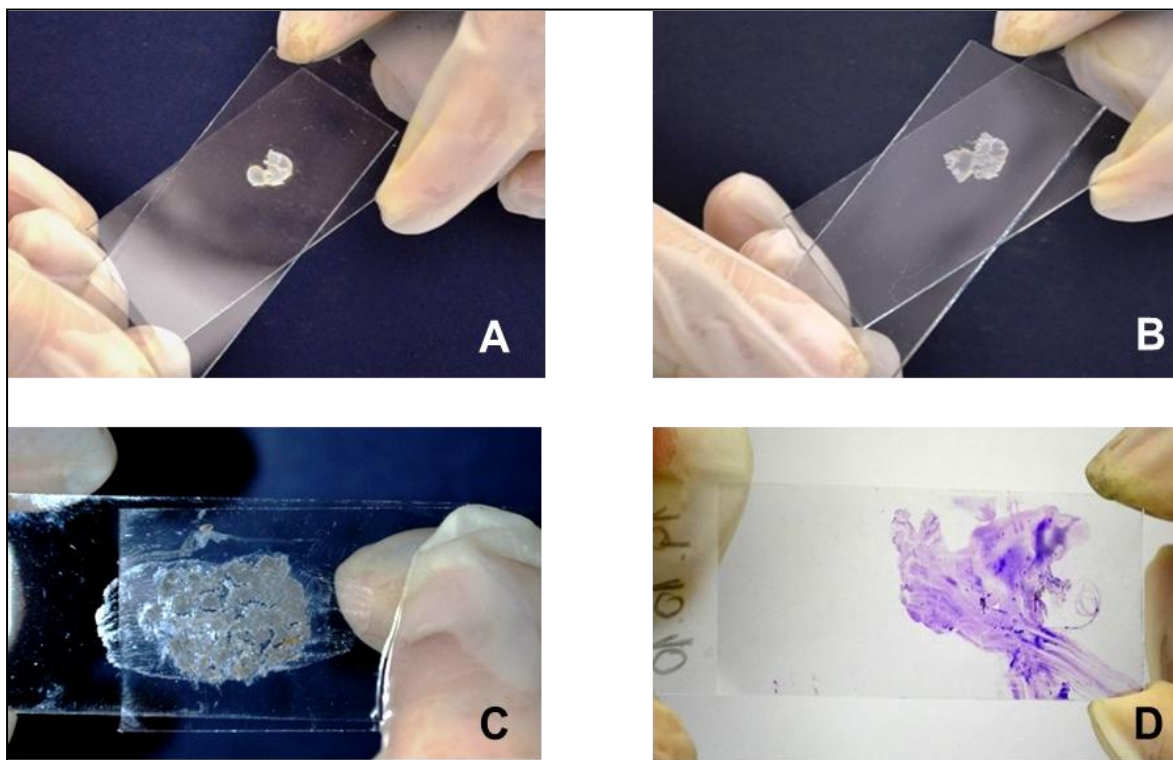


3.4 Exames laboratoriais

3.4.1 *Press imprint smear*

Para a realização da técnica do *press imprint smear*, o fragmento de biópsia, de 2 a 3 mm foi colocada no centro de uma lâmina de vidro e outra lâmina foi usada para cobrir o fragmento de tecido na forma de sanduíche. O fragmento foi pressionado e movimentos circulares foram realizados para esmagar o tecido. Em seguida, fez-se o deslizamento de uma lâmina sobre a outra, para distender a amostra, diminuindo a espessura do fragmento. As lâminas foram, então, coradas com Giemsa e examinadas ao microscópio (Figura 14).

Figura 14 – Passos do *press imprint*. A e B: Biópsia sendo pressionada entre duas lâminas. C: Material sendo distendido sobre a lâmina. D: Lâmina corada pelo Giemsa.



3.4.2 Histologia

As biópsias das lesões foram fixadas em formalina a 10% e submetidas a processamento histológico de rotina e emblocadas em parafina. Cortes com espessura de 4 μ m, obtidos em micrótomo digital Leica, foram desparafinizados com xilol, reidratados e corados com Hematoxilina & Eosina, Wade (para pesquisa de BAAR) e Grocott (para pesquisa de fungos). Os preparados foram examinados em microscópio óptico.

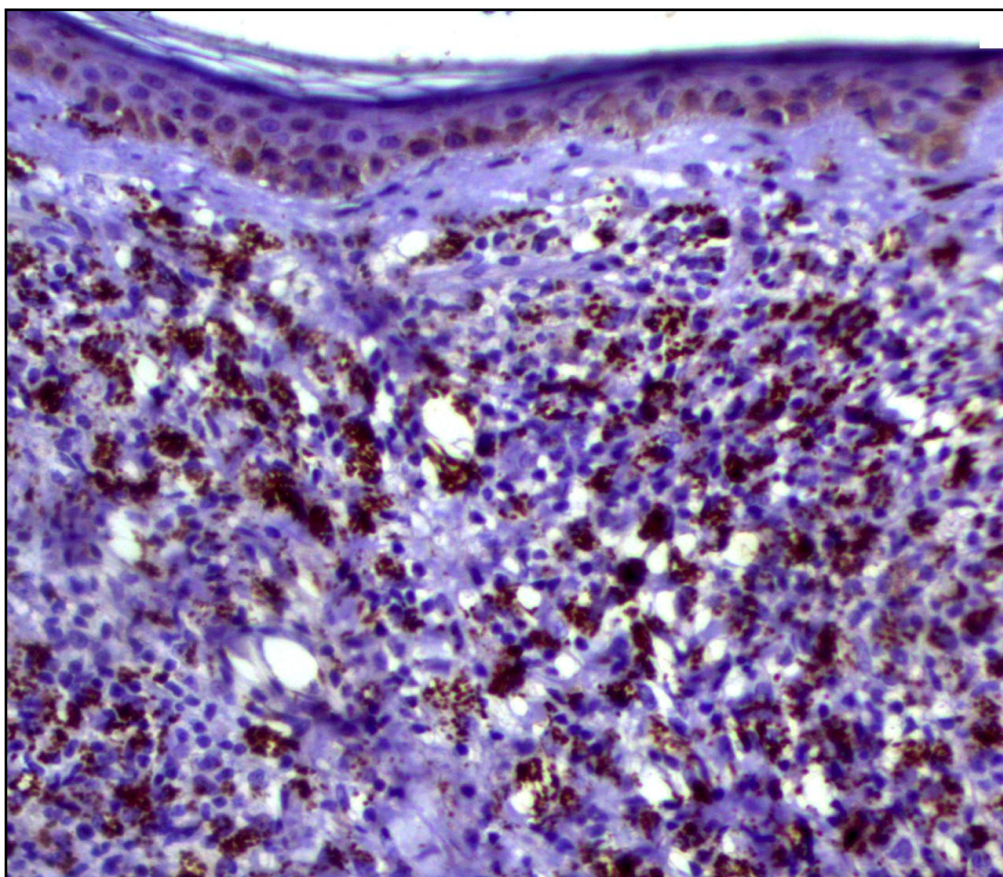
3.4.3 Imuno-histoquímica

3.4.3.1 Padronização da técnica

Para a realização da técnica de imuno-histoquímica, os blocos de parafina contendo os fragmentos de pele foram cortados em micrótomo, na espessura de 4 μ m e montados em lâminas previamente lavadas e silanizadas. Foram confeccionadas duas lâminas de cada amostra contendo de dois a quatro cortes cada. Para a pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania*, empregou-se soro hiperimune de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* como anticorpo primário.

Para a padronização, foram avaliadas diferentes concentrações de diluição do anticorpo, visando obter uma melhor visualização das formas amastigotas, sem a ocorrência de colorações inespecíficas (“background”). Para a determinação do título do anticorpo primário, foram feitas reações de imuno-histoquímica, com as seguintes diluições do soro hiperimune: 1/25, 1/50, 1/100, 1/150, 1/200, 1/300, 1/400, 1/600 em amostras de controle. Como controle positivo, foram empregados fragmentos de pele de um paciente sabidamente positivo para LC. A diluição do soro selecionada foi a de 1/600, em que as formas amastigotas foram devidamente identificadas nos fragmentos de pele humana, sem a ocorrência de coloração de fundo. Como controle negativo, foi utilizada a mesma amostra do controle positivo, sem a adição do anticorpo primário durante a reação (Figura 15).

Figura 15 – Lâmina de imuno-histoquímica. Controle positivo com diluição de anticorpo de 1/600. (Aumento 1000x).



3.4.3.2 Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos foram submetidos primeiramente ao processo de desparafinização, por meio de 3 banhos em xilol de 5 minutos cada, seguidos de um banho em

Acetona PA por 5 minutos. A hidratação foi realizada por meio de banhos de álcool em concentrações decrescentes, seguidos por banhos em água corrente, destilada e PBS (Solução de Tampão Fosfato – pH 7,2 e 0,01M).

A recuperação antigênica foi realizada em um tanque de pré-tratamento *Dako*[®] *PT Link*, que possibilita um banho-maria em sistema fechado, com temperatura monitorizada e controlada automaticamente por computador. Primeiramente, o sistema foi pré-aquecido até 65°C, no qual as lâminas foram colocadas e em seguida o sistema permaneceu em 97°C por 30 minutos, seguido de um resfriamento até 65°C.

Os cortes histológicos foram demarcados com caneta hidrofóbica *Dako*[®] *Pen*, utilizada para demarcar a área e impedir vazamento de reagentes. Para realização do bloqueio da peroxidase, foi adicionado *EnVision*[™] *Flex Peroxidase-Blocking* *Dako*[®] por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos ao bloqueio da proteína, com utilização de *Protein Block Serum-Free* *Dako*[®] por 1 hora, mantidos em câmara úmida.

O anticorpo foi adicionado em concentração 1/600 e incubado por 1 hora em câmara úmida vedada. Em seguida, foi adicionado o polímero livre de biotina *EnVision*[™] *Flex/HRP* *Dako*[®] por 30 minutos. A reação foi então revelada com cromógeno *Dako*[®] à base de Diaminobenzidina (DAB) por 30 minutos em ambiente escuro. Para contracoloração foi utilizada Hematoxilina de Meyer por 5 minutos, seguida de banhos em água destilada, água corrente e amônia (0,037 mol/L).

Os cortes foram desidratados e diafanizados, por meio de dois banhos em álcool absoluto de 2 minutos cada e três banhos de xilol de 1 minuto cada. Em seguida, deu-se a montagem das lâminas com utilização de Bálsamo do Canadá. Após secagem das lâminas, os cortes foram avaliados em microscópio óptico com investigação de presença de amastigotas coradas em tecido, bem como a avaliação de possível coloração em macrófagos, células epiteliais, células endoteliais e persistência de peroxidase endógena. As amostras foram examinadas por dois observadores e os resultados discordantes foram resolvidos no consenso.

3.4.4 Critério de análise dos resultados

Todas as análises e gráficos foram realizados usando o software GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A significância

mínima foi aceita quando $p < 0,05$ pelo teste exato de Fisher. Para avaliação da acurácia dos ensaios utilizados neste estudo, foram calculados os parâmetros de sensibilidade e valores preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN).

3.4.5 Considerações Éticas

Por se tratar de um estudo envolvendo seres humanos, de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São José de Doenças Infecciosas para avaliação e parecer. O projeto foi aprovado, sob número de protocolo nº 006/2009 e iniciado após sua aprovação.

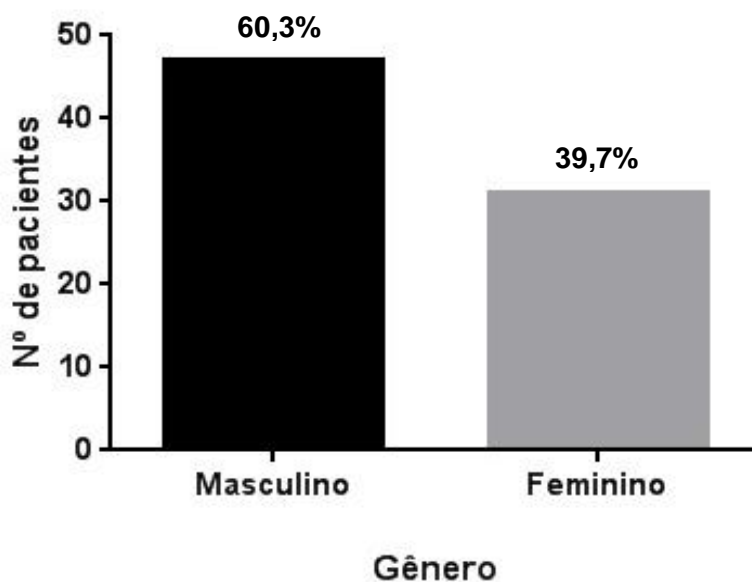
4 RESULTADOS

4.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos

Foram recrutados para participar do estudo 80 pacientes que procuraram espontaneamente o ambulatório de leishmanioses do Hospital São José de Doenças Infecciosas para avaliação clínica. Todos apresentavam suspeita clínica de LC, entretanto 2 pacientes foram excluídos do estudo por apresentarem todos os resultados negativos para os testes realizados.

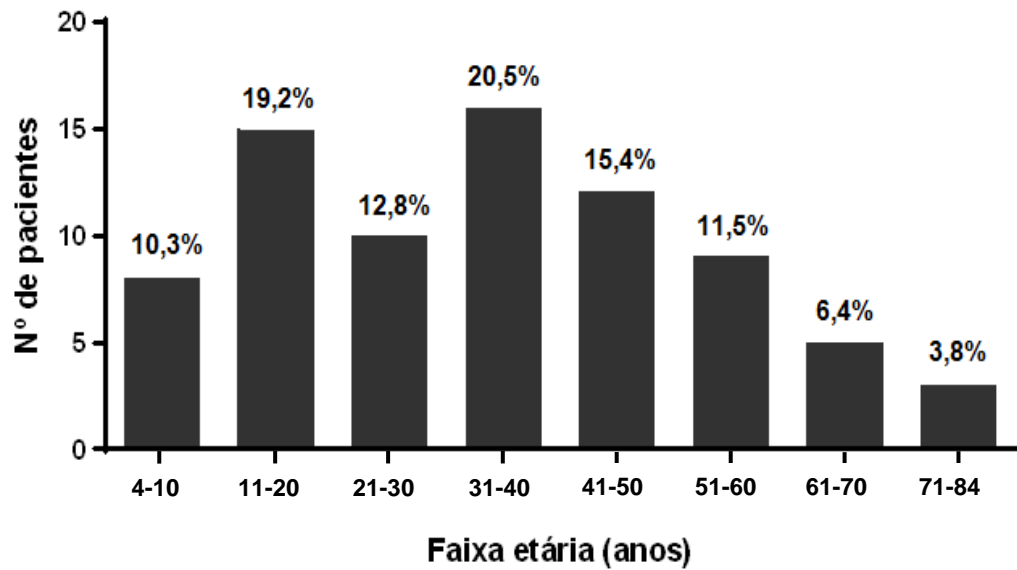
Dos 78 participantes do estudo, 47 (60,3%) pertenciam ao gênero masculino e 31 (39,7%) ao feminino (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC, de acordo com o gênero.



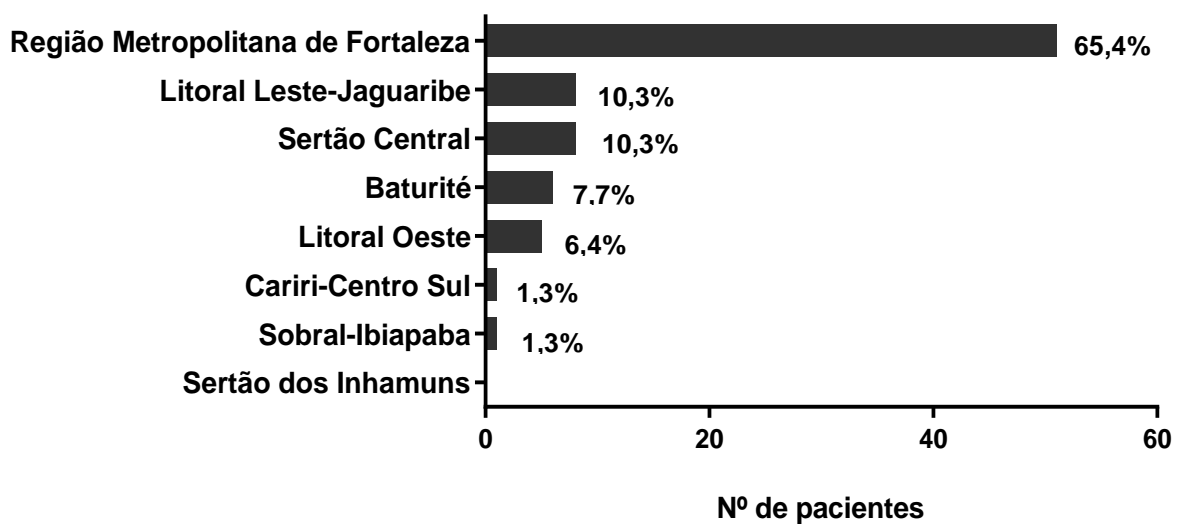
A faixa etária variou entre 4 e 84 anos de idade, apresentando uma média de 35,1 anos. A faixa entre 31 e 40 anos de idade representava 20,5% dos participantes, enquanto apenas 3,8% possuíam entre 71 e 80 anos (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC participantes do estudo, de acordo com a faixa etária.



Quanto ao local de residência, os participantes do estudo foram distribuídos de acordo com as macrorregiões do Ceará, sendo a grande maioria proveniente da Região Metropolitana de Fortaleza (65,4%) (Gráfico 3).

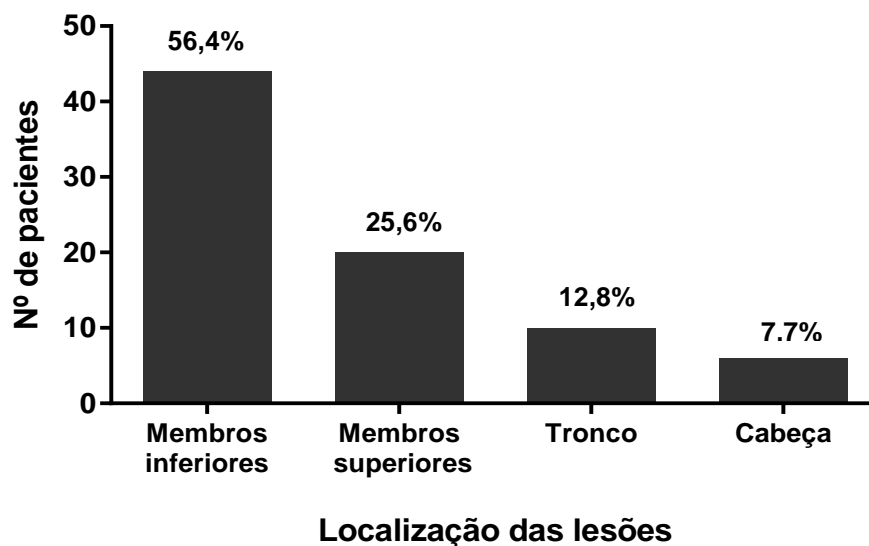
Gráfico 3 – Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC, de acordo com a residência.



Quanto às lesões cutâneas, os 78 (100%) pacientes apresentaram lesões de pele típicas da LC, distribuídas da seguinte maneira: 52 (66,7%) pacientes tinham lesão única, 19 (24,4%) duas lesões e 7 (9,0%) possuíam múltiplas lesões pelo corpo. Dentre essas lesões, a grande

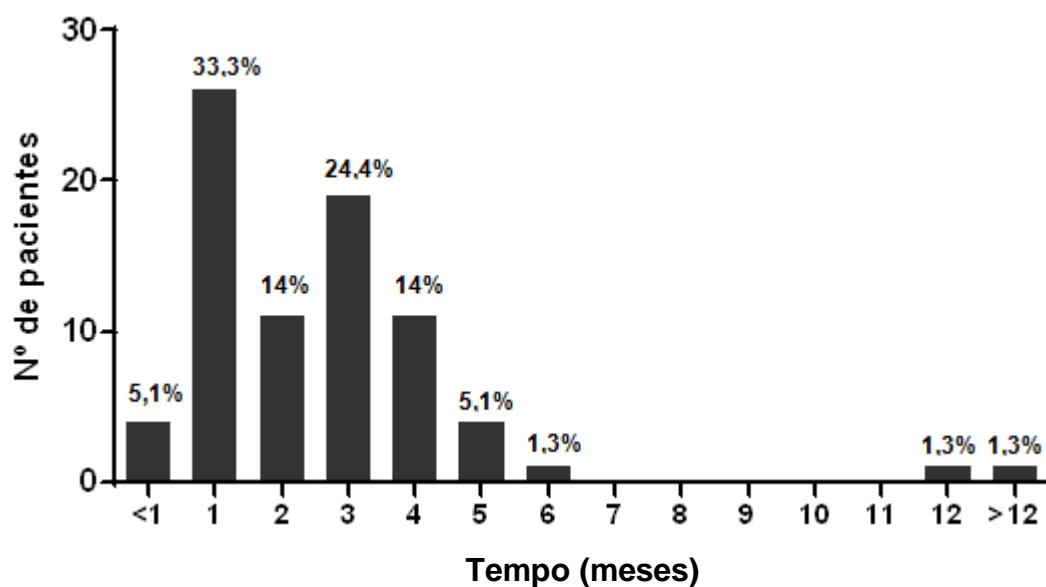
maioria encontrava-se localizada nos membros inferiores (56,4%), entretanto também foi possível encontrar lesões nos membros superiores, no tronco e na cabeça (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Distribuição dos 78 pacientes com suspeita de LC, de acordo com a localização das lesões.



O tempo de surgimento das lesões, até a procura do ambulatório apresentou grande variação, desde 2 semanas até mais de 1 ano. Entretanto, a grande maioria dos participantes buscou ajuda médica com 1 mês de evolução da doença (33,3%) (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Tempo de surgimento das lesões dos 78 pacientes com suspeita de LC.

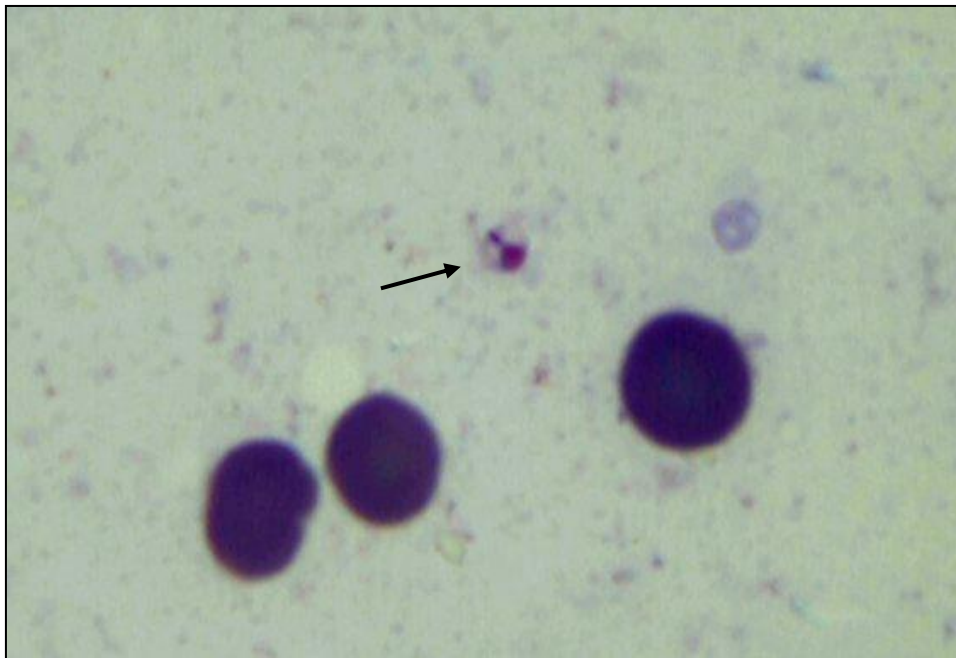


4.2 Resultado dos exames

4.2.1 *Press imprint smear*

O *press imprint smear* foi realizado nas amostras de todos os 78 pacientes participantes do estudo, evidenciando 48 (61,5%) amostras positivas e 30 (38,5%) negativas (Gráfico 6) (Figura 16).

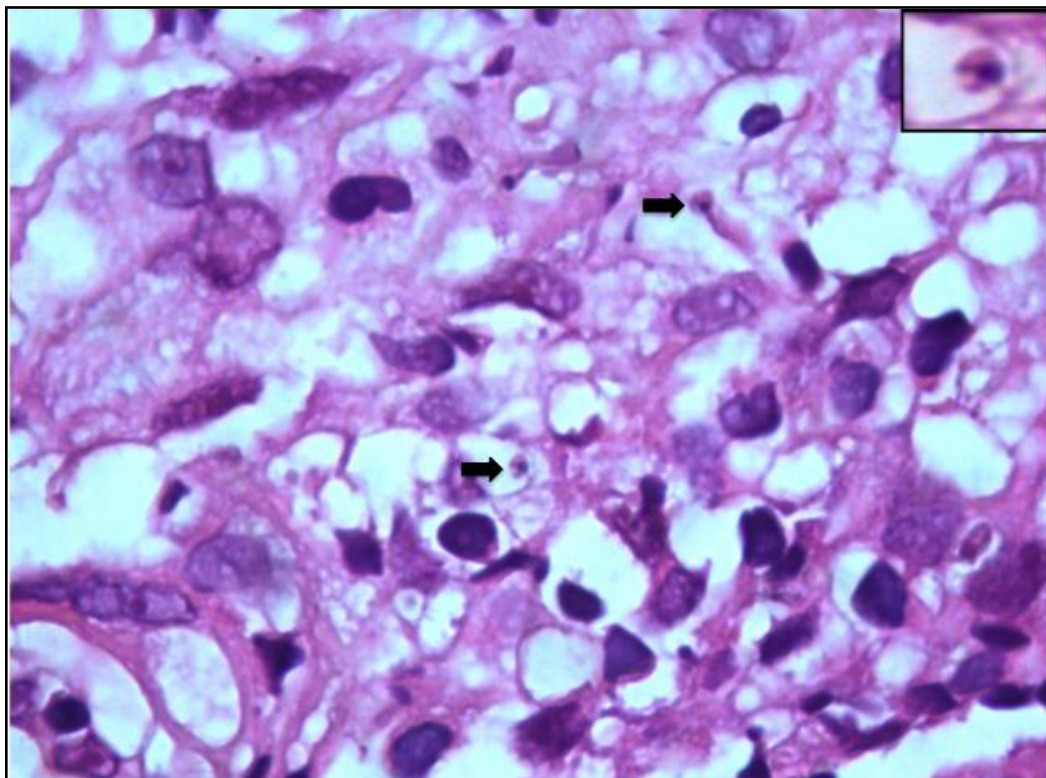
Figura 16 – Microfotografia de esfregaço de *press imprint smear*, evidenciando uma amastigota (seta). (Aumento 1000x).



4.2.2 Exame histológico

O exame histológico foi realizado nas amostras de todos os 78 pacientes participantes do estudo, apresentando 35 (44,9%) amostras positivas e 43 (55,1%) negativas (Gráfico 6) (Figura 17). Todas as amostras foram negativas para a pesquisa de BAAR (coloração de Wade) e fungos (coloração de Grocott).

Figura 17 – Microfotografia de corte histológico de amostra de lesão de paciente com suspeita de LC, apresentando amastigotas no campo. (Aumento 1000x).



Em comparação com o *press imprint smear*, o exame histológico mostrou uma menor positividade e apenas 38,5% dos pacientes apresentaram resultado positivo nos dois testes, enquanto 5 (6,4%) foram positivos para o exame histológico e negativo para o *press imprint smear* (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação do resultado do *press imprint smear* com o resultado do exame histológico de 78 pacientes com suspeita de LC.

		Histológico		
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)
<i>Press Imprint smear</i>	Positivo n (%)	30 (38,5)	18 (23,0)	48 (61,5)
	Negativo n (%)	5 (6,4)	25 (32,1)	30 (38,5)
	Total n (%)	35 (44,9)	43 (55,1)	78 (100,0)

4.2.3 Imuno-histoquímica

O teste de imuno-histoquímica foi realizado nas amostras de apenas 75 pacientes, devido a problemas no corte histológico de algumas biópsias, impossibilitando a realização da técnica em todas as amostras.

Foi observado dois padrões de visualização: um evidenciando as amastigotas inteiras e o outro mostrando antígeno parcialmente degradado, representado por fina granulação acastanhada no citoplasma dos macrófagos (Figura 18). Ambas as marcações foram consideradas como evidência de positividade. Desse modo, a técnica de imuno-histoquímica apresentou um alto índice de detecção de casos, com 72 (98,6%) das amostras positivas (Gráfico 6).

Comparada ao exame histológico, a imuno-histoquímica mostrou uma maior positividade e apenas 33 (45,2%) pacientes apresentaram resultado positivo nos dois testes, enquanto 39 (53,4%) foram positivos para a imuno-histoquímica e negativos para o histológico (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação do resultado do exame histológico com o resultado da técnica de imuno-histoquímica (n=73).

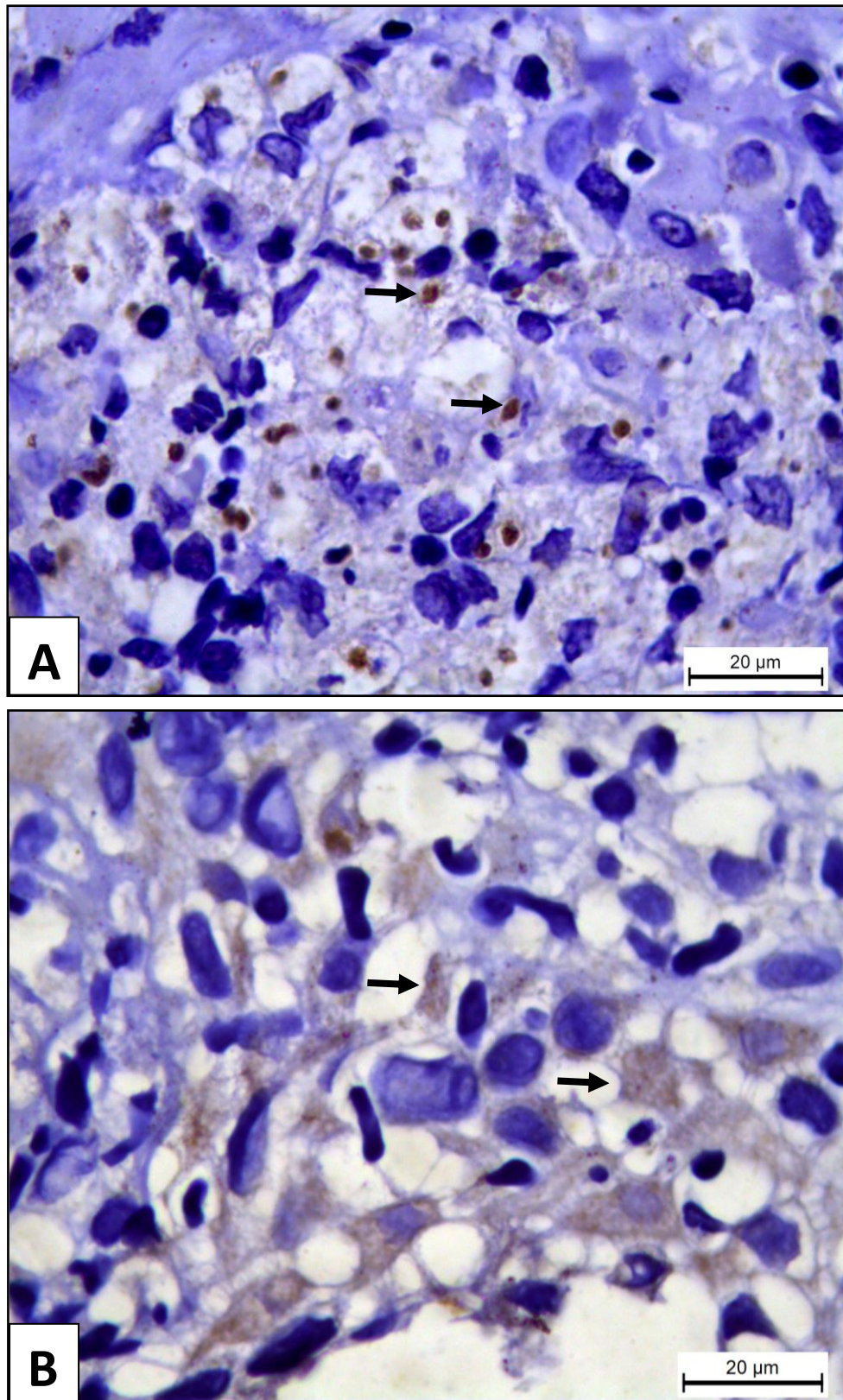
		Imuno-histoquímica		
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)
Histopatológico	Positivo n (%)	33 (45,2)	0 (0,0)	33 (45,2)
	Negativo n (%)	39 (53,4)	1 (1,4)	40 (54,8)
	Total n (%)	72 (98,6)	1 (1,4)	73 (100,0)

Em comparação com o *press imprint smear*, a imuno-histoquímica mostrou uma maior positividade e mais da metade (57,5%) dos pacientes apresentaram resultado positivo nos dois testes, enquanto 30 (41,1%) foram positivos para a imuno-histoquímica e negativos para o *press imprint smear* (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação do resultado do *press imprint smear* com o resultado da técnica de imuno-histoquímica (n=73).

		Imuno-histoquímica		
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	Total n (%)
<i>Press Imprint smear</i>	Positivo n (%)	42 (57,5)	1 (1,4)	43 (58,9)
	Negativo n (%)	30 (41,1)	0 (0,0)	30 (41,1)
	Total n (%)	72 (98,6)	1 (1,4)	73 (100,0)

Figura 18 – Microfotografia de lâmina de imuno-histoquímica de lesão de paciente com suspeita de LC, apresentando diversas amastigotas (A) e antígenos fragmentados (B) em evidência no campo (seta). (Aumento 1000x).

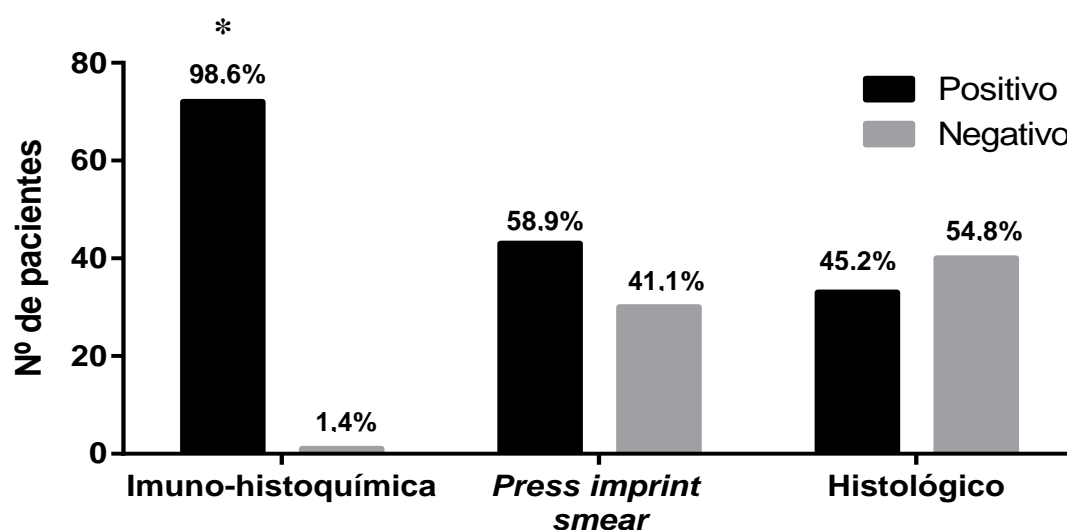


4.2.4 Comparação entre os testes realizados

4.2.4.1 Resumo dos resultados

Os resultados dos testes realizados foram agrupados no Gráfico 6 e Tabela 4. A técnica de imuno-histoquímica apresentou positividade estatisticamente significativa em relação à positividade dos outros testes realizados (ambos $p < 0,001$).

Gráfico 6 – Resumo dos resultados dos testes realizados (n=73).



(*) Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os resultados da imuno-histoquímica e outros exames realizados.

Tabela 4. Resumo dos resultados encontrados para os testes realizados (n=73).

Resumo dos resultados		
	Positivo n (%)	Negativo n (%)
Imuno-histoquímica	72 (98,6)	1 (1,4)
Press imprint smear	43 (58,9)	30 (41,1)
Histológico	33 (45,2)	40 (54,8)

Tabela 5. Comparação dos resultados encontrados para os testes realizados (n=73). IHQ: Imuno-histoquímica, PIS: *Press Imprint Smear*, H: Histológico.

	IHQ + PIS + H	IHQ + PIS	IHQ + H	PIS + H
Positivo	28 (38,4%)	42 (57,5%)	33 (45,2%)	30 (41,1%)
Negativo	0	0	1 (1,4%)	25 (34,2%)

4.2.4.2 Sensibilidade

Foram agrupados na Tabela 5 os resultados do *press imprint smear* e do exame histológico, acrescidos dos seus respectivos valores de sensibilidade. Foi utilizado como padrão-ouro o teste de imuno-histoquímica, que apresentou uma melhor eficácia na detecção dos casos positivos, com sensibilidade de 98,6%.

Tabela 6. Sensibilidade dos testes realizados, utilizando como padrão-ouro a imuno-histoquímica.

Teste	Positivo (%)	Negativo (%)	Sensibilidade %	n
Imuno-histoquímica	72 (98,6)	1 (1,4)	98,6	73
<i>Press imprint smear</i>	43 (58,9)	30 (41,1)	58,3	73
Histológico	33 (45,2)	40 (54,8)	45,8	73

4.2.4.3 Valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN)

Os testes foram avaliados quanto aos seus valores preditivos, que apresentam a proporção de pacientes com resultados verdadeiramente positivos ou negativos entre os diagnosticados (Tabela 7).

Tabela 7. Valor preditivo positivo e negativo dos testes realizados.

Teste	VPP %	VPN %
<i>Press imprint smear</i>	97,7	0,0
Histológico	100,0	2,5

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados e comparados diferentes exames laboratoriais em amostras de 78 pacientes com suspeita clínica de LC atendidos no Hospital São José de Doenças Infecciosas. Uma avaliação clínico-epidemiológica também foi realizada, baseada nos dados coletados dos participantes.

A epidemiologia das leishmanioses no Brasil tem mudado nos últimos anos. Inicialmente, considerou-se LC uma zoonose de animais apenas silvestres, que foi acidentalmente transmitida aos seres humanos quando eles entraram em contato com florestas para exploração, extração de madeira, construção de estradas ou fins de mineração. A condição era, por conseguinte, uma doença profissional, que só afetava indivíduos do sexo masculino. No entanto, mais recentemente, as intensas alterações ambientais associadas ao desmatamento e desenvolvimento agrícola também fizeram agricultores vulneráveis à doença. Em áreas onde o agente patogênico está presente, embora alguns casos estejam associados às atividades profissionais, há também relatos de transmissão entre mulheres e crianças (DE CASTRO *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2014).

Neste estudo, houve prevalência da LC em indivíduos do gênero masculino (60,3%) sobre o feminino (39,7%), corroborando com o perfil encontrado no estado, onde 51,3% dos indivíduos acometidos pela doença em 2009 eram do sexo masculino (BRASIL, 2011). Esse dado demonstra que houve um acometimento de ambos os sexos, podendo estar associado às atividades ocupacionais e de lazer em áreas consideradas de risco (GONTIJO & CARVALHO, 2003). Entretanto, esse fato também pode estar relacionado à transmissão peridomiciliar da leishmaniose na região, com a construção de casas em áreas favoráveis à proliferação de flebotomíneos, além da presença de animais infectados que mantém uma enzootia doméstica (REITHINGER *et al.*, 2007).

Na amostra estudada, a LC predominou em indivíduos na faixa etária laborativa, mais requisitada para o trabalho e sujeita a maior exposição ao vetor, com média de 35,1 anos. Tais resultados estão em concordância com estudos realizados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, em 2011 (BRASIL, 2011).

Murback e colaboradores (2011) realizaram uma revisão dos prontuários de 47 pacientes com suspeita de LC em Mato Grosso do Sul e notaram que o grupo mais afetado foi representado por adultos do sexo masculino (72,3% dos casos), e em proporções menores,

houve envolvimento de crianças e mulheres (8,5% e 27,7%, respectivamente) (MURBACK *et al.*, 2011). O maior envolvimento de indivíduos menores de 20 anos, bem como de pessoas do sexo feminino foi observado em outras regiões do país. Em um estudo epidemiológico na macrorregião de Campinas-SP foram identificados 458 casos, com predominância nas áreas urbanas (57%), do sexo masculino (62%), com maior prevalência na faixa etária 30-50 anos (34%). Isto mostra o crescimento da capacidade de adaptação do vetor a regiões peridomésticas (SILVA & CUNHA, 2007).

Quanto ao local de residência, a grande maioria dos participantes do estudo residia na Região Metropolitana de Fortaleza (65,4%). Sertão Central e Litoral Leste-Jaguaribe foram outras regiões em destaque. De acordo com boletim epidemiológico de 2009, os municípios de Barbalha, São Benedito e Ibiapina eram os mais atingidos e representaram 25,6% do total de casos do estado (BRASIL, 2011). A LC é mais comum em áreas rurais, desde florestas tropicais até regiões áridas. No entanto, está se tornando cada vez mais relatada em áreas urbanas e peri-urbanas no mundo devido a diversos fatores, como o desmatamento de áreas rurais e o aumento de densidade do vetor em outras regiões. Além disso, viajantes estão cada vez mais envolvidos em atividades de ecoturismo ao ar livre, que as tornam um risco maior de contrair a doença. Ao longo da última década, houve um aumento casos relacionados com o turismo nacional e internacional, operações militares, o afluxo de imigrantes de países endêmicos e pessoas infectadas pelo HIV (AHLUWALIA *et al.*, 2004; ANTINORI *et al.*, 2005; PAVLI & MALTEZOU, 2010).

Na maior parte dos pacientes (76,9%) as lesões eram recentes, com até 03 três meses de evolução. Em apenas 20,5% dos pacientes o tempo de surgimento das lesões variou entre quatro a mais de 12 meses, consoante ao trabalho realizado por Vieira e colaboradores em 2008 na Bahia, onde 78% dos pacientes apresentavam lesões com até 3 meses de evolução. É possível observar que a procura por atendimento médico tem se tornado menos tardio, refletindo um maior acesso da população à serviços de saúde (VIEIRA-GONÇALVES *et al.*, 2008; NOGUEIRA *et al.*, 2001). Em áreas mais remotas vê-se que a média entre o início dos sintomas e a procura por assistência médica foi de cerca de 10 meses, como no trabalho de Silva e colaboradores no Acre (SILVA *et al.*, 1999), refletindo que o acesso à saúde é fator fundamental no tempo de aparecimento dos sintomas até a procura por auxílio médico.

A localização das lesões foi, em sua maioria, em áreas mais expostas do corpo. Dado semelhante foi encontrado no trabalho de D'ÁVILA e colaboradores em São Paulo, onde 60%

das lesões dos pacientes encontravam-se em membros superiores e inferiores (D'ÁVILA *et al.*, 2004). Áreas mais expostas do corpo estão mais susceptíveis ao contato com o flebotomíneo vetor, dando maior possibilidade ao desenvolvimento da doença e aparecimento de lesão (PAVLI & MALTEZOU, 2010). Quanto ao número de lesões, 66,7% dos pacientes apresentaram uma única lesão e em 24,4% duas lesões, concordando com estudos anteriores, que evidenciam que o percentual de pacientes com até duas lesões de LC varia entre 64 e 92% (CORTE *et al.*, 1996; D'ÁVILLA *et al.*, 2004).

O diagnóstico de LC é baseado numa combinação da história epidemiológica do paciente (exposição), os sinais clínicos, sintomas e o diagnóstico laboratorial, que comumente são feitos tanto pela observação de amastigotas em esfregaços diretos da lesão, corados com Giemsa, ou por exame histológico de uma biópsia da pele (REVEIZ *et al.*, 2013).

Devido a LC poder ser confundida clinicamente com outras doenças, é de fundamental importância sua confirmação laboratorial para definição diagnóstica e instalação da terapêutica adequada. No Brasil, a LC é uma doença em crescimento, com casos e vetores relatados em todo o país e, embora o diagnóstico de laboratório empregue ferramentas com diferentes complexidades, a aplicação destas ferramentas depende da infraestrutura e recursos encontrados nas regiões afetadas. Em algumas regiões do país, o diagnóstico ainda é comumente baseado apenas no quadro clínico das lesões, com o apoio da reação intradérmica de Montenegro. No entanto, estas indicações não são suficientes para confirmar o diagnóstico em áreas que se sobrepõem com agentes etiológicos de apresentação clínica semelhante. Por isso, o Ministério da Saúde tem concentrado seus esforços na implementação de exame direto como uma ferramenta de apoio diagnóstico, principalmente porque são métodos de simples execução e baixo custo operacional. No entanto, é essencial que tais métodos sejam padronizados e sua sensibilidade conhecida, de modo que possa ser aplicado com segurança em todo o país (BRASIL, 2007; DE MELLO *et al.*, 2011).

Desde que o diagnóstico precoce é uma das medidas mais eficazes de controle de infecção, a adoção de métodos eficientes e de baixo custo é essencial, principalmente nos níveis primários de atendimento (SZARGIKI *et al.* 2009). Apesar de diversos métodos serem utilizados para o diagnóstico de LC, incluindo métodos moleculares e inoculação em animais, o diagnóstico parasitológico é o método principal de confirmação laboratorial da doença. Devido ao baixo custo, pela facilidade e rapidez de execução, por não necessitar de equipamentos sofisticados de laboratório e poder ser realizado mesmo em unidades de saúde

sem muita infraestrutura, o exame microscópico direto ainda representa o método mais adequado para o diagnóstico de leishmaniose (RAMIREZ *et al.*, 2000; HASHEMI *et al.*, 2011).

Neste estudo, dos 78 pacientes analisados, 61,5% mostraram positividade pelo método do *press imprint smear*, que apresentou sensibilidade de 58,3%. Na literatura, a capacidade de detecção do *imprint* convencional varia desde 36,6% (BARI *et al.*, 2010) a 54,3% (GAZOZAI *et al.*, 2010). Entretanto é necessário ressaltar que a técnica de *imprint* deixa em evidência apenas as células mais superficiais da lesão estudada, visto que o material é proveniente apenas da pressão da área mais externa da lesão sobre a lâmina (SCHUBACH *et al.*, 2001; CAPUTO, 2008; AL-HUCHEIMI *et al.*, 2009). A técnica do *press imprint smear* possibilita a observação das camadas mais profundas da lesão, devido à coleta da amostra, proveniente de biópsia, e da técnica de esmagamento do material, possibilitando uma amostragem mais representativa da lesão.

O exame histológico conseguiu detectar apenas 44,9% dos casos positivos, com sensibilidade de 45,8%. Em outros estudos, os resultados são bem diversos, variando de valores menores de 20% a 72%, na dependência da espécie de *Leishmania* e do tempo de doença (FERREIRA *et al.*, 2006; BARI & RAHMAN, 2008; AL-HUCHEIMI *et al.*, 2009; GAZOZAI *et al.*, 2010).

O *imprint* convencional tende a apresentar uma sensibilidade variada, devido à origem da amostra ser apenas superficial e não representativa o suficiente da lesão. Ainda assim, geralmente, apresenta uma positividade maior que o exame histológico. Bahamdan e colaboradores realizaram um estudo em 29 pacientes comparando o exame histológico com o *imprint* convencional. Dos 21 pacientes positivos, em 18 foram encontrados parasitas pelos dois métodos. Em 3 casos, os organismos foram identificados apenas pelo *imprint* (BAHAMDAN *et al.*, 1996). Em outro estudo, realizado por Schubach e colaboradores, incluindo 88 casos, parasitos de *Leishmania* foram detectados em 30,2% dos casos por exame histológico, 28,2% por *imprint* convencional, 43,4%, utilizando culturas, 41,4% por imunofluorescência e 58,5% usando imunoperoxidase (SCHUBACH *et al.*, 2001). Em outro estudo, onde foram comparados métodos diagnósticos em 177 pacientes da Colômbia, o exame histológico apresentou sensibilidade de 14%, *imprint* 19% e cultura do aspirado da lesão com 58% (WEIGLE *et al.*, 1987). Entretanto, em alguns casos o exame histológico apresentou maior positividade. Dar e Khurshid estudaram amostras de 78 pacientes que

resultaram positivas pelo exame histológico em 89,7% dos casos, raspado da lesão em 32% e *imprint* em 34,6% (DAR & KHURSHID, 2005).

Comparando os resultados do *press imprint smear* com o histológico, observa-se que o primeiro apresentou uma sensibilidade maior (58,3%) que o segundo (45,8%). A técnica do *press imprint smear* melhora a qualidade do esfregaço, possibilita a visualização de um maior número de células da lesão, aumentando a chance de detecção do parasito na amostra, mesmo quando os pacientes apresentam lesões com mais tempo de evolução.

Infecções fúngicas na pele podem ser clinicamente semelhantes à leishmaniose. Esporotricose, cromomicose, paracoccidioidomicose e histoplasmoses foram relatados. No entanto, histologicamente, a presença frequente de necrose dérmica associada com hiperplasia pseudo-epiteliomatosa e a formação de abscessos intra-epidérmicos, juntamente com a identificação de elementos fúngicos, diferenciam estas doenças (QUINTELLA *et al.*, 2009). Neste trabalho, foi utilizada coloração de Grocott específica para fungos nas amostras de todos os pacientes, com resultado negativo.

A demonstração do parasito é muito importante para o diagnóstico da leishmaniose. Em pacientes que foram infectados com inóculo pequeno ou que estão na fase crônica da doença, a detecção histológica dos parasitos nos tecidos é difícil (DANESHBOD *et al.*, 2010; AMEEN, 2010). Apesar do diagnóstico parasitológico permanecer sendo o mais utilizado por apresentar uma alta especificidade, a sensibilidade da microscopia e cultura tendem a ser baixas e podem ser altamente variáveis, dependendo do número e da dispersão dos parasitos em amostras de biópsia, do procedimento de coleta e das habilidades técnicas dos profissionais envolvidos (HERWALDT, 1999). Apesar desses fatores, a microscopia ainda é o método de diagnóstico padrão nos níveis de saúde terciários e secundários. No nível primário, na maioria das áreas endêmicas, não há pessoal qualificado para realizar as técnicas mais simples, muito menos as técnicas mais sofisticadas que apresentam um alto custo e por isto não estão, em geral, disponíveis em nenhum nível de atenção (REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

Em um estudo no Rio de Janeiro uma análise histopatológica de 20 casos mostrou que amastigotas foram encontradas em apenas duas amostras (VIEIRA-GONÇALVES *et al.*, 2008). Venkataraman & Moosa em 2001 avaliaram a correlação entre o padrão clínico e histológico da LC em 40 pacientes, onde foram identificados quatro padrões histológicos: infiltração difusa de macrófagos, sem necrose; infiltração de macrófagos com necrose; início

de reação granulomatosa e granuloma epitelióide, sem amastigotas. Foi observado também que o número de amastigotas diminuiu à medida que a doença evoluiu. Na infecção por *L. braziliensis*, as células infectadas são geralmente evidenciadas nas primeiras semanas da doença. Após este período, os parasitos se tornam mais raros, com um infiltrado denso de células plasmáticas, linfócitos e macrófagos não infectados (VENKATARAMAN *et al.*, 2001).

Em um extenso e clássico estudo de LC no Brasil, analisaram-se biópsias de 378 pacientes infectados com *L. braziliensis* que através das alterações dérmicas permitiram identificar a existência de cinco padrões histológicos: 1-reação exsudativa celular; 2-reação exsudativa e necrótica; 3-reação exsudativa e necrótica-granulomatosa; 4-reação exsudativa e granulomatosa e 5-reação exsudativa e tuberculóide. Os parasitos, embora escassos, foram encontrados em 63,7% dos casos de forma cutânea e em 37,5% dos casos de forma mucosa. Através desse estudo, foi possível afirmar que o padrão de reação exsudativa celular constitui o quadro inicial e final da lesão, com os demais padrões aparecendo interpostos durante a evolução da doença (MAGALHÃES *et al.*, 1986). É importante destacar que o diagnóstico histopatológico de certeza da LC só é possível mediante o achado dos parasitas. Caso contrário, as alterações histopatológicas são, no máximo, sugestivas do diagnóstico (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

A técnica de imuno-histoquímica apresenta um padrão celular que considera a presença de amastigotas e antígenos fragmentados de *Leishmania* como evidência de positividade da amostra (SCHUBACH *et al.*, 2001). Neste estudo, ao ser considerado positivo não apenas a marcação de amastigotas no corte, mas também de antígenos, o teste demonstrou a presença de *Leishmania* em 98,6% das amostras.

Apesar da imuno-histoquímica apresentar diferença significativa na detecção dos casos positivos em relação aos outros métodos estudados, deve ser levado em consideração que a técnica detecta antígenos fragmentados, enquanto os exames diretos possuem a capacidade de detectar apenas amastigotas inteiras. Mesmo com essa limitação, o *press imprint smear* ainda foi capaz de detectar mais casos positivos que o exame histológico, comum na rotina laboratorial.

A imuno-histoquímica possibilita uma melhor visualização das amastigotas e dos antígenos. O substrato cromógeno produz uma camada de precipitado no local da reação e resulta em uma espessa camada difusa marrom sobrepondo o complexo, dando as amastigotas

uma aparência maior do que é observado na coloração de hematoxilina-eosina (SHIRIAN *et al.*, 2014).

Alteração vascular inflamatória e presença de antígenos livres de *Leishmania* já foram descritos anteriormente em biópsias de pele de LC. Os autores propuseram que complexos imunes seriam formados *in situ* e que o antígeno solúvel seria localizado no endotélio (VERESS & EL HASSAN, 1986; RIDLEY E RIDLEY, 1986). De acordo com SCHUBACH *et al.* (2001), a sugestão da aplicação de padrões celulares marcados em imuno-histoquímica no diagnóstico da LC é coerente com alguns eventos fisiopatológicos. Os macrófagos são células hospedeiras de *Leishmania*, participando também da defesa contra esses parasitos. Desse modo, o material granular marcado positivamente encontrado no seu citoplasma deve corresponder a antígenos de *Leishmania*, tal como a observada em áreas de necrose (MAUEL, 1982; RIDLEY & RIDLEY, 1986). Entretanto, apesar do alto índice de positividade, deve-se levar em consideração que o teste pode apresentar background inespecífico de acordo com a metodologia de imuno-histoquímica empregada, devido à atividade enzimática endógena, fixação deficiente, a degradação da amostra e a presença de anticorpos naturais e proteínas, contaminando o material (BOENISCH *et al.*, 2001).

Observa-se que a imuno-histoquímica e outros métodos moleculares apresentam um melhor desempenho diagnóstico que a rotina de exame direto (QUINTELLA *et al.*, 2009; SCHUBACH *et al.*, 2001; FAGUNDES *et al.*, 2010). Benicio e colaboradores (2011) avaliaram métodos diagnósticos em uma área endêmica da Amazônia brasileira. Os autores estudaram 180 pacientes e realizaram biópsia da pele para exame histológico, PCR e cultura. A histologia apresentou apenas 50% de sensibilidade e sua associação com a PCR foi a melhor combinação, aumentando a sensibilidade de detecção da doença para 94% (BENICIO *et al.*, 2011). Em um estudo comparativo de testes diagnósticos, os métodos moleculares foram os mais sensíveis, com sensibilidade de 100% e 97% para a PCR e IHQ, respectivamente. Os exames diretos apresentaram valores de sensibilidade mais baixos, chegando a 42% em lesões atípicas pelo exame histológico (SHIRIAN *et al.*, 2014). Alves e colaboradores, em 2013, encontraram sensibilidade de 91,8% para técnica de IHQ, enquanto o exame histológico apresentou apenas 17,8% de sensibilidade (ALVES *et al.*, 2013). Entretanto, estas abordagens moleculares mais sensíveis não estão disponíveis em todos os estabelecimentos de saúde. Excluindo-se o exame microscópico direto, outros métodos exigem uma estrutura laboratorial complexa e habilidades técnicas, bem como períodos mais longos de tempo para obter os resultados (GOTO & LINDOSO, 2010).

Os valores de acurácia dos testes, em relação à sensibilidade e valores preditivos apresentaram grande variação. Sabe-se que a capacidade de detecção dos testes varia em função de sua sensibilidade, da intensidade do parasitismo e da acuidade do profissional na leitura das lâminas. Como já demonstrado, a carga parasitária na LC diminui com o tempo de evolução da doença. À medida que o processo crônico granulomatoso se organiza, diminui o número de parasitos, tornando-se difícil seu achado em lesões mais antigas (MURBACK *et al.*, 2011). Além disso, o tempo de realização do exame também tem influência no resultado. Quanto maior o tempo de observação da lâmina pelo profissional, melhor a capacidade de análise da amostra (DA SILVA *et al.*, 2005).

O *press imprint smear* é uma técnica de execução muito rápida, com possibilidade de obtenção do resultado no mesmo dia da aquisição da amostra do paciente. O exame histológico apresenta uma metodologia mais elaborada, com um período necessário de 2 a 3 dias para sua execução, devido às diversas etapas de processamento da biópsia, e de 7 a 30 dias para a liberação do laudo, comprometendo a instituição rápida da terapêutica. A técnica de imuno-histoquímica também apresenta uma metodologia mais complexa, necessitando de cerca de 8 horas para sua execução. Além disso, o *press imprint smear* necessita de poucos materiais para sua execução, tornando-o um exame fácil e barato. Duas lâminas, corante e um microscópio óptico são suficientes para possibilitar a análise da amostra, facilitando a realização do exame, mesmo em áreas remotas que não possuam infraestrutura adequada. O exame histológico necessita de diversos equipamentos para sua execução, além de um patologista especializado para leitura da lâmina, bem como a imuno-histoquímica que necessita, ainda, de reagentes e anticorpos específicos (Dados do Serviço de Patologia do DPML-UFC; MEHREGAN *et al.*, 1999).

O diagnóstico de LC deve, sempre que possível, ser apoiado clinicamente, apresentando evidência epidemiológica combinada com testes laboratoriais. O desempenho destes métodos varia grandemente e depende de vários fatores, entre os quais a carga parasitária, tempo de evolução da lesão, local onde o parasito é investigado, a qualidade do material coletado e da experiência do técnico responsável (MARKLE & MAKHOUL, 2004; AMEEN, 2010).

Por estas razões, a existência de métodos que confirmem a presença do parasito na amostra são essenciais. A falta de um padrão de ouro real para o diagnóstico da leishmaniose, com alta sensibilidade e especificidade, pode haver consequências importantes para as

definições de sensibilidade e especificidade de outros testes estudados. Estudos comparativos de protocolos devem ser encorajados e atualizados para os mais recentes desenvolvimentos tecnológicos no campo. Mais importante ainda, devem ser feitos estudos multicêntricos com amostras de tamanhos adequados para permitir comparações estatísticas de protocolos de diagnóstico avaliados, onde protocolos de custo-benefício devem ser determinados e procedimentos operacionais padrão devem ser recomendados (REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

Os dados deste trabalho mostram que o *press imprint smear* é uma técnica promissora e que pode auxiliar no diagnóstico por exame direto na rotina laboratorial. A ampliação desse estudo, comparando o desempenho do *press imprint smear* com outras técnicas moleculares, como PCR, é necessária para confirmação destes dados.

De um modo geral, o *press imprint smear* mostrou-se uma técnica bastante vantajosa em comparação a outros métodos, por apresentar fácil execução, resultado rápido, não necessitar de equipamentos sofisticados e ser de baixo custo, ao contrário de outras técnicas já descritos na literatura e utilizadas na rotina laboratorial. Além disso, apresentou-se aplicável em centros de saúde, por demandar de estrutura laboratorial simples e ser de fácil execução, dentro da realidade político social do Brasil.

6 CONCLUSÃO

- Os dados clínico-epidemiológicos corroboram com outros achados encontrados na literatura, onde a maioria dos participantes é do sexo masculino, entre 31 e 40 anos, residente da Região Metropolitana de Fortaleza, com menos de duas lesões nos membros inferiores e até 3 meses de evolução da doença;
- O *Press imprint smear* apresentou melhor desempenho que o exame histológico, sendo capaz de detectar um maior número de casos positivos;
- O *Press imprint smear* apresentou menor desempenho que a imuno-histoquímica, com uma menor positividade;
- A técnica mais sensível foi a imuno-histoquímica (98,6%), seguida pelo *press imprint smear* (58,3%) e o histológico como técnica menos sensível (45,8%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLUWALIA S, LAWN SD, KANAGALINGAM J, GRANT H, LOCKWOOD DN. Mucocutaneous leishmaniasis: an imported infection among travelers to Central and South America. **Br Med J**, v. 329, p. 842-844, 2004.

AL-HUCHEIMI, S. N.; SULTAN, B. A.; AL-DHALIMI, M. A. A comparative study of the diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis in Iraq by polymerase chain reaction and microbiologic and histopathologic methods. **Int J Dermatol**, v. 48, p. 404-408, 2009.

ALVES, C. F.; ALVES, C. F.; FIGUEIREDO, M. M.; SOUZA, C. C.; COELHO, L. L. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; RASO, P.; SOARES, R. P. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. **PLoS ONE** v. 8, p. 343-351, 2013.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis: Current scenario and prospects for treatment. **Act. Trop**, v. 105, p. 1-9, 2008.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol**, v.35, p. 699-705, 2010.

ANDRADE, M. S.; BRITO, M. E. F.; DA SILVA, S. T.; LIMA, B. S.; ALMEIDA, E. L.; ALBUQUERQUE, E. L.; MARINHO JÚNIOR, J. F.; ISHIKAWA, E.; CUPOLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, S. P. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in military training area of Zona da Mata in Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, p. 229-233, 2005.

ANTINORI, S.; GIANELLI, E.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; GRAMICCIA, M.; CORBELLINO, M. Cutaneous leishmaniasis: an increasing threat for travelers. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, p.343-346, 2005.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v.30, p.1269-1281, 2000.

ASHFORD, R. W.; BATES, P. A. Leishmaniasis in the Old World. **Parasitology**, v. 5, p. 215-240, 1998.

BAHAMDAN, K. A., KHAN, A. R., TALLAB, T. M. and MOURAD, M. M. Value of touch preparations (imprints) for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 35, p. 558-560, 1996.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol**, v. 25, p. 203-211, 2007.

BARI, A. U.; BARI, A. U.; SHEHZAD, A.; AMER, E.; TARIQ, M. Comparison of various cytodagnostic tests in the rapid diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **J Pak Assoc Derma Apr**, v. 20, p. 63-69, 2010.

BARI, A. U.; RAHMAN, S. B. Many faces of cutaneous leishmaniasis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 74, p. 23-27, 2008.

BASANO, A. S.; CAMARGO, L. M. A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 328-337. 2004.

BENICIO, E. D. E. A.; GADELHA, E. P.; TALHARI, A.; SILVA, R. M. J. R.; FERREIRA, L. C.; SANTOS, M. C. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. **An Bras Dermatol**, v. 86, p. 1141-1144, 2011.

BERMAN, J.D. Leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, v.24, p.684-703, 1997.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.86, n.1, p.51-56, 1991.

BOENISCH, T. Immunochemical staining methods. Dako Corporation, 2001.

BOURDOISEAU, G.; MARCHAL, T.; MAGNOL, J. P. Immunohistochemical detection of *Leishmania infantum* in formalin-fixed, paraffin-embedded sections of canine skin and lymph nodes. **J Vet Diagn Invest**, v.9, p.439, 1997.

BRANDÃO-FILHO, S. P.; CARVALHO, F. G.; BRITO, M. E. F.; ALMEIDA, F. A.; NASCIMENTO, L. A. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco Brazil: Eco-epidemiological aspects in “Zona da Mata” Region. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 445-449, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 1ª ed. Brasília, 2006.

_____. Ministério da Saúde. **Boletim de Saúde de Fortaleza**. Secretaria Municipal de Saúde - Fortaleza. Zoonoses: v.10, n.1, 2006.

_____. Ministério da Saúde. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 8ª ed. Brasília, 2010.

_____. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 7ª ed. Brasília, 2009.

_____. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2007.

_____. Ministério da Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Ceará**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 5ª ed. Brasília, 2009.

_____. Ministério da Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de**

situação: Ceará. Secretaria de Vigilância em Saúde. 5ª ed. Brasília, 2011.

CAPUTO, L. F. G. Manual da disciplina de histotecnologia do curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: 2008.

CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; BITTENCOURT, A.; MARSDEN, P. D. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315-325, 1994.

CARVALHO, E. M.; CORREA-FILHO, D.; BARCELAR, O.; ALMEIDA, R. P.; LESS, H.; ROCHA, H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 53, p. 273-277, 1995.

CONVIT, J.; ULRICH, M.; FERNANDEZ, C. T.; TAPIA, F. J.; CÁCERES-DITMAR, G.; CÁSTES, M.; RONDÓN, A. J. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, p. 444-448, 1993.

CORTE, A. A.; NOZAWA, M. R.; FERREIRA, M. C.; PIGNATTI, M. G.; RANGEL, O.; LACERRA, S.S. Eco-epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the Municipality of Campinas, São Paulo, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v.12, n.4, p.465-472, 1996.

COSTA, J. M. L.; MARSDEN, P. D.; LLANOS-CUENTAS, E. A.; NETO, E. M.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A.; ROSA, A. C.; CUBA, C. C.; MAGALHÃES, A. V.; BARRETO, A. C. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report on eight cases. **J Trop Med Hyg**, v. 89, p. 318-323, 1986.

COSTA, S. M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J. C.; LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil Mini-review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 149-153. 2007.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol**, v. 72, p. 132-141, 2002.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; DE O LIVEIRA-NETO, M. P.; DE BRITO, M. E.; FALQUETO, A.; DE FARIAS NAIFF, M.; GRIMALDI, G. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J. Clin. Microbiol**, v. 41, p. 3126-3132, 2003.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G. J. R.; MOMEN, H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. **Ann. Trop. Med. Parasitol**, v. 89, p. 17-23, 1995.

D'ÁVILA, S. C. G. P.; SILVA, J.; MEDOLA, B. O.; SHIBUKAWA, R. H. Retrospective study of American Cutaneous Leishmaniasis cases diagnosed in the

Pathology Laboratory of Hospital de Base-FAMERP: a clinical and anatomopathological focus. **Arq Ciênc Saúde**, v. 11, n. 2, p. 2-5, 2004.

DA SILVA, M. R.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 72, p. 811-814, 2005.

DANESHBOD, Y.; DEHGHANI, S. J.; DANESHBOD, K. Bone marrow aspiration findings in kala-azar. **Acta Cytol**, v. 54, p. 12-24, 2010.

DANTAS-TORRES, F.; CAVALCANTI, M. P.; FIGUEREDO, L. A.; MELO, M. S. F. J.; ALMEIDA, E. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Cutaneous and visceral leishmaniosis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Vet Parasitol**, v. 170, p. 313-317, 2010.

DE CASTRO, E. A.; SOCCOL, V. T.; MEMBRIVE, N.; LUZ, E. Epidemiological and clinical study of 332 cases of cutaneous leishmaniasis in the north of Parana State from 1993 to 1998. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, p. 445-452, 2002.

DE LORENZI, D.; MANDARA, M. T.; TRANQUILLO, M. Squash–prep cytology in the diagnosis of canine and feline nervous system lesions: a study of 42 cases. **Vet Clin Path**, v. 35, p. 208-214, 2006.

DE MELLO, C. X.; DE OLIVEIRA, S. A.; DE OLIVEIRA, R. V.; CONCEIÇÃO, S. F.; PIMENTEL, M. I.; LYRA, M. R.; VASCONCELLOS, E. C.; DE FÁTIMA, M. 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**, v. 109, p. 927-933, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol Infect Dis**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Me Hyg**, v. 95, p. 239-243, 2001

FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A.; PAULA, C. C.; BOGIO, A.; ANTONIO, L. D. E. F.; SCHIAVONI, P. B.; MONTEIRO, V. D. E. S.; MADEIRA, M. D. E. F.; QUINTELLA, L. P.; VALETE, R. C. M.; VASCONCELLOS, E. D. E. C.; AZEREDO, C. R. B.; PACHECO, R. S.; MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, p. 109-112, 2010.

FERNANDES, N. C.; MORGAN, I.; MACEIRA, J. P. American Tegumentary Leishmaniasis; hospitalized cases in Rio de janeiro. **An Bras Dermatol**, v. 79, p. 431-439, 2004.

FERREIRA, M. P.; ROSELINO, A. M.; NASCIMENTO, M. M.; AIRES, J. M.; FIGUEIREDO, J. F. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-L. brasiliensis antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 48, p. 215-217, 2006.

- FERRER, L.; RABANAL, R. M.; DOMINGO, M.; RAMOS, J. A.; FONDEVILA, D. Identification of *Leishmania donovani* amastigotes in canine tissues by immunoperoxidase staining. **Res Vet Sci**, v.4, p.194–196, 1988.
- FORATTINI, O. P.; PATOLLI, D. B. G.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo. **Brasil. Rev Saude Publica**, v. 6, p. 431-433, 1972.
- FORATTINI, O. P.; PATOLLI, D. B. G.; RABELLO, E. X.; FERREIRA, O. A. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo. **Brasil. Rev Saude Publica**, v. 7, p. 181-184, 1973.
- FURTADO, T. Critérios para diagnóstico de LTA. **An Bras Dermatol**, v. 65, p. 51-86, 1980.
- GARCIA, F. C. B.; DOS SANTOS, S. S. R.; CHOCIAY, M. F.; MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis (ATL): comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of *leishmania* species in skin sample. **An Bras Dermatol**, v. 80, p. 339-344, 2005.
- GAZOZAI, S.; IQBAL, J.; BUKHARI, I.; BASHIR, S. Comparison of diagnostic methods in cutaneous Leishmaniasis (histopathology compared to skin smears). **Pak J Pharm Sci**, v. 23, p. 363-366, 2010.
- GOMES, A. H.; ARMELIN, I. M.; MENON, S. Z.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Exp Parasitol**, v. 119, p. 319-242, 2008.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, L. B. American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, p. 419-433, 2010.
- GREVELINK, S. A.; LERNER, E. Leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol**, v. 34, p. 257-272, 1996.
- GRIMALDI, G.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 37–42, 1996.
- GRIMALDI, J. R. G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev**, v. 6, p. 230-250, 1993.
- GUERRA, J. A.; PRESTES, S. R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L. I.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M. G.; FERREIRA, L. C. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, p. 980, 2011.

GUTIERREZ, Y.; SALINAS, G. H.; PALMA, G.; VALDERRAMA, L. B.; SANTRICH, C. V.; SARAVIA, N. G. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. **Am J Trop Med Hyg**, v.45, p.281-289, 1991.

HASHEMI, S. N.; MOHEBALI, M.; MANSOURI, P.; BAIRAMI, A.; HAJJARAN, H.; AKHOUNDI, B.; CHAREHDAR, S. Comparison of leishmanin skin test and direct smear for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Acta Med Iran*, v. 49, p. 136-141, 2011.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-1199, 1999.

KENNER, J. R.; ARONSON, N. E.; BRATTHAUER, G. L.; TURNICKY, R. P.; JACKSON, J. E.; TANG, D. B.; SAU, P. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **J Cutan Pathol**, v.26, p.130-136, 1999.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 77, p. 569-596, 1983.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: W Peters & R Killick-Kendrick (eds) - *The Leishmaniasis in biology and Medicine. Biology and Epidemiology*, Academic Press, London, v.1, p.1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 7, p. 1-19, 1973.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis. The Neotropical *Leishmania* species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Parasitology*, v. 5, p. 242-266. 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Some reservoir-hosts of *Leishmania* in wild animals of Mato Grosso State, Brazil. Two distinct strains of parasites isolated from man and rodents. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 63, p. 408-409, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 75, p. 530-536, 1981.

LERNER, E.; RIBEIRO, J.; NELSON, R.; LERNER, M. R. Isolation of Maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpes*. **J Biol Chem**, v. 266, p. 11234-11236, 1991.

LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 73(6), p.843-847, 2007.

LIVNI, N.; ABRANOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E.; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared

histological sections. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v.401, n.2, p.147-151, 1983.

LLANOS-CUENTAS, E. A.; MARSDEN, P. D.; CUBACUBA, C.; BARRETO, A. C.; CAMPOS, M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. **Lancet**, v. 2, p. 295, 1984.

LUNEDO, S. N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; DE CASTRO, E. A.; TELLES, J. E. Immunocytochemical and immunohistochemical methods as auxiliary techniques for histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Acta Histochem**, v. 114, p. 252-258, 2012.

MAGALHÃES, A. V.; MORAES, M. A. P.; RAICK, A. N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J. M. L.; CUBA, C. C.; MARSDEN, P. D. Histopatologia da Leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Rev Inst Méd Trop São Paulo**, v.28, p.253-262, 1986.

MARKLE, W.; MAKHOUL, K. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. **Am Fam Physician**, v. 69, p. 1455-1460, 2004.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (Espundia Escomel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p.859-876, 1986.

MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; LAURIS, J. R. P.; MARTINS, A. C. G. P. American tegumentary leishmaniasis: correlation among immunological, histopathological and clinical data. **An Bras Dermatol**, v. 89, p. 52-58, 2014.

MARZOCHI, M. C. A Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J Bras Med**, v. 63, p. 82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and for their control. **Cad Saude Publica**, v. 10, p. 359-375, 1994.

MAUEL, J. In vitro induction of intracellular killing of parasitic protozoa by macrophages. **Immunobiology**, v.16, p. 392-400, 1982.

MEHREGAN, D. R.; MEHREGAN, A. H.; MEHREGAN, D. A. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol**, v.17, n.3, p.297-304, 1999.

MITRA, S.; KUMAR, M.; SHARMA, V.; MUKHOPADHYAY, D. Squash preparation: A reliable diagnostic tool in the intraoperative diagnosis of central nervous system tumors. **J Cytol**, v. 27, p. 81-85, 2010.

MURBACK, N. D.; HANS, F. G.; NASCIMENTO, R. A.; NAKAZATO, K. R.; DORVAL, M. E. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 86, p. 55-63, 2011.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v.366, p. 1561–1577, 2005.

NAME, R. Q.; BORGES, K. T.; NOGUEIRA, L. S. C.; SAMPAIO, J. H. D.; TAUIL, P. L.; SAMPAIO, R. N. R. Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis seen at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil. **An Bras Dermatol**, v. 80, p. 249-254, 2005.

NAVIN, T.R.; ARANA, F.E.; DE MÉRIDA, A.M.; ARANA, B.A.; CASTILLO, A.L.; SILVERS, D.N. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. **Am. J. Trop. Med Hyg.**, v.42, p.36-42, 1990.

NOGUEIRA, L.S.C.; SAMPAIO, R.N.R. Case series study of cutaneous leishmaniasis (CL): epidemiology and treatment. **An Bras Dermatol**, v.76, n.1, p.51-62, 2001.

NYLEN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 34, p. 551-561, 2012.

PASSOS, V.M.A.; FERNANDES, O.; LACERDA, P.A.F.; VOLPINI, A.C.; GONTIJO, C.M.F.; ROMANHA, A.J. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with american cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, v.72, p.251-258, 1999.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **Int J Infect Dis**, v. 14, p. 1032-1039, 2010.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**, v.22, p. 1-13, 1996.

PIRMEZ, C.; DA SILVA, T. V.; PAES-OLIVEIRA, N. M.; DA-CRUZ, A. M.; DA COSTA, G. S. C.; CATANHO, M.; DEGRAVE, W.; FERNANDES, O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 1819-1823, 1999.

POURMOHAMMADI, B.; MOTAZEDIAN, M.; HATAM, G.; KALANTARI, M.; HABIBI, P.; SARKARI, B. Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Iran J. Parasitol**, v. 5, p. 1-8, 2010.

QUINTELLA, L. P.; CUZZI, T.; MADEIRA, M. F.; OKAMOTO, T.; SCHUBACH, A. O. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.51, n.2, p.83-86, 2009.

RAMIREZ, J. R.; AGUDELO, S.; MUSKUS, C. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitological diagnosis. **J Clin Mic**, v. 38, p. 3768-3773, 2000.

RAMOS-E-SILVA, M. & JACQUES, C.M.C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. **Clin. Dermatol.**, v.20, p.122-134, 2002.

RAMOS-VARA, J. A.; KIUPEL, M.; BASZLER, T.; BLIVEN, B. T.; BLIVEN, L.; BRODERSEN, B.; CHELACK, B.; CZUB, S.; DEL PIERO, F.; DIAL, S.; EHRHART, E. J.; GRAHAM, T.; MANNING, L.; PAULSEN, D.; VALLI, V. E.; WEST, K. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J Vet Diagn Invest**, v.20, p.393–413, 2008.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 937–954, 2009.

REBÊLO, J. M. M. Hourly frequency and seasonality of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) on São Luís Island, Maranhão, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v.17, p.221-227, 2001.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. **J Clin Microbiol**, v. 45, p. 21-25, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; SIMON BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, p. 581–596, 2007.

REVEIZ, L.; MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; NICHOLLS, R. S.; SIERRA, R. G. A.; YADON, Z. E. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PLoS ONE**, v. 8, p. 843-857, 2013.

RIDLEY, M. J.; RIDLEY, D. S. Monocyte recruitment, antigen degradation and localization in cutaneous leishmaniasis. **Br J Exp Pathol**, v. 67, p. 209-218, 1986.

ROCHA, R. M.; MILLER, K.; SOARES, F.; VASSALLO, J.; SCHENKA, N.; GOBBI, H. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast câncer. **Applied Cancer Research**, v.29, n.3, p.112-117, 2009.

RODRÍGUEZ, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **J Clin Microb**, v. 32, p. 2246-2252, 1994.

ROMERO, G. A.; DE LA GLORIA, O. O. M.; DE FARIAS, G. M. V.; PAES, M. G.; DE OLIVEIRA, M. V.; DE CARVALHO, E. M. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Trop**, v. 93, p. 49–56, 2005.

ROMERO, G. A.; SAMPAIO, R. N. R.; MACEDO, V. O. M.; MARSDEN, P. D. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis, in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v.9, p. 505-508, 1999.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **Br Med J**, v. 28, p. 1401, 1903.

SALINAS, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G.; MONTES, G.; SARAIVIA, N. G. Detección de amastigotas en leishmaniasis cutanea y mucocutanea por el metodo de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con metodos convencionales de diagnostico. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.84, p. 53-60, 1989.

SALMAN, S.M.; RUBEIZ, N.; KIBBI, A. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clin. Dermatol.**, v.17, p. 291-296, 1999.

SARAIVIA, N. G. L.; VALDERRAMA, M.; LABRADA, A. F.; HOLGUÍN, C.; NAVAS, G.; PALMA, A.; WEIGLE, K. A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 159, p. 725-735, 1989.

SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M. S.; ARAÚJO, M. L.; SOUZA, W. J.; HADDAD, F.; PEREZ, M. D. E. A.; PACHECO, R. S.; MOMEN, H.; COUTINHO, S. G.; DE ALMEIDA, M. M. C.; MARZOCHI, K. B.; DA COSTA, S. C. Leishmanial Antigens in the Diagnosis of Active Lesions and Ancient Scars of American Tegumentary Leishmaniasis Patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, 987-996, 2001.

SHAH, A. B.; MUZUMDAR, G. A.; CHITALE, A. R.; BHAGWATI, S. N. Squash Preparation and Frozen section in Intraoperative diagnosis of central nervous system tumors. **Acta Cytol**, v. 42, p. 1149-1154, 1998.

SHIRIAN, S.; ORYAN, A.; HATAM, G. R.; PANAHI, S.; DANESHBOD, Y. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, p. 235-240, 2014.

SILVA, L. M. R.; CUNHA, P. R. Urbanization of American Cutaneous Leishmaniasis in Campinas – Sao Paulo (SP) and region: problems and challenges. **An Bras Dermatol**, v. 82, p. 515-519, 2007.

SILVA, N. S.; VIANA, A.B.; CORDEIRO, J.A.; CAVASINI, C.E. American cutaneous leishmaniasis in the State of Acre, Brazil. **Rev Saúde Pública**, v.33, n.6, p. 554-559, 1999.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Especial Reference to the Disease in Amazonian Brazil – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p. 239-251, 2004.

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med Res**, v.123, p. 311-330, 2006.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med**, v. 49, p. 55–60, 2003.

SOTTO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; DA MATTA, V. L.; DE BRITO, T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Tropica**, v. 476, p. 121-130, 1989.

SZARGIKI, R.; CASTRO, E. A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, A. M.; THOMAZ, S. V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 13, p. 47-52, 2009.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **J Immunol Methods**, v.292, n. 1-2, p. 17-23, 2004.

VASCONCELOS, I. A. B.; VASCONCELOS, A. W.; FILHO, N. M.; QUEIROZ, R. G.; SANTANA, E. W.; BOZZA, M. The identity of *Leishmania* isolated from sandflies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 50, p. 158-164, 1994.

VENKATARAM, M.; MOOSA, M.; DEVI, L. Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: a study in Oman. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 67, p. 294–298, 2001.

VERESS, B.; EL HASSAN, A. M. Vascular changes in human leishmaniasis: a light microscope and immunohistological study. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 80, p. 183-188, 1986.

VIDIGAL, C. D. E. P.; MARCUSSI, V. M.; MARCUSSI, L. M.; MIKCHA, J. M.; ARRAES, S. M.; LONARDONI, M. V.; SILVEIRA, T. G. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 107, p. 208-212, 2008.

VIEIRA, M. G.; OLIVEIRA, F.; ARRUDA, S.; BITTENCOURT, A. L.; BARBOSA, A. A. JR; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 979-983, 2002.

VIEIRA-GONÇALVES, R.; PIRMEZ, C.; JORGE, M. E.; SOUZA, W. J.; OLIVEIRA, M. P.; RUTOWITSCH, M. S.; DA-CRUZ, A. M. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. **Int J Dermatol**, v. 47, p. 926-932, 2008.

WEIGLE, K. A.; DE DÁVALOS, M.; HEREDIA, P.; MOLINEROS, R.; SARAVIA, N.G.; D'ALESSANDROS, A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 36, p. 489-496, 1987.

WEIGLE, K. A.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol**, v. 14, p. 433-450, 1996.

WHO. Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, 22-26 March 2010.

_____. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Geneva, 2013.

APÊNDICE A - TABELA COM DADOS CLÍNICO -EPIDEMIOLÓGICOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Caso	Gênero	Idade	Tempo de lesão	Município	Nº de lesões	Local das lesões
1	M	30	1 mês	Pereiro	1	ombro
2	F	10	1 mês	Pereiro	1	quadril
3	M	18	2 semanas	Pereiro	1	esterno
4	F	15	3 semanas	São João do Jaguaribe	1	braço
5	M	31	1 mês	Pereiro	1	joelho
6	F	58	1 mês	Pereiro	4	mão e braço
7	M	45	1 mês e 2 sem	Horizonte	1	face
8	M	8	1 mês e 2 sem	Maracanaú	2	perna
9	M	19	1 mês	Fortaleza	1	perna
10	M	60	3 meses	Itatira	1	pé
11	M	12	1 mês e 2 sem	Horizonte	2	perna
12	F	46	1 mês e 1 sem	Eusébio	3	coxa
13	F	34	3 meses e 1 sem	Fortaleza	1	braço
14	M	40	1 ano	Pedra Branca	2	pé
15	M	4	4 meses	Caucaia	1	costas
16	M	34	4 meses	Aquiraz	1	perna
17	M	11	4 meses	Maracanaú	1	pESCOÇO
18	M	26	3 meses	Horizonte	1	perna
19	F	73	3 meses	Aquiraz	1	perna
20	M	65	4 meses	Aquiraz	1	costas
21	F	84	4 meses	Itaitinga	1	pé
22	F	30	3 meses	Aquiraz	2	braço
23	M	24	1m e 2s	Fortaleza	1	perna
24	F	34	1 mês	Canindé	2	face
25	F	14	3 meses	Fortaleza	1	perna
26	F	22	3 meses	Horizonte	8	coxa e perna
27	M	49	1 mês	Aquiraz	2	tórax
28	F	43	2 semanas	Aquiraz	2	braço
29	M	19	1 mês	Horizonte	2	perna
30	M	10	1 mês	Itatira	1	braço
31	F	38	4 meses	Aquiraz	2	pé
32	M	46	1 mês e 2 sem	Horizonte	1	braço
33	F	57	2 meses	Eusébio	1	joelho
34	F	10	2 meses	Horizonte	2	perna
35	M	11	2 meses	Fortaleza	4	braço e mão
36	M	22	4 meses	Horizonte	1	costas
37	M	16	3 meses	Fortaleza	1	perna
38	F	46	3 meses	Horizonte	1	perna
39	F	30	1 ano e 3 meses	Fortaleza	1	perna

APÊNDICE A - TABELA COM DADOS CLÍNICO -EPIDEMIOLÓGICOS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO (CONTINUAÇÃO)

Caso	Gênero	Idade	Tempo de lesão	Município	Nº de lesões	Local das lesões
40	F	52	1 mês	Fortaleza	2	pé e punho
41	M	62	2 meses	Horizonte	2	perna e punho
42	M	59	1 mês e 2 sem	Horizonte	1	coxa
43	F	47	4 meses	Acarape	1	perna
44	M	5	3 meses	Itatira	2	face e joelho
45	M	43	4 meses	Pacajus	1	braço
46	M	46	3 meses	Aratuba	1	perna
47	F	7	1 mês e 10 dias	Trairi	1	joelho
48	F	50	1 mês	Horizonte	1	coxa
49	M	7	2 meses	Aratuba	1	costas
50	M	32	3 meses	Aquiraz	múltiplas	vários locais
51	F	26	2 meses	Horizonte	1	perna
52	M	69	1 mês e 2 sem	Boa Viagem	2	Braço
53	M	40	3 meses	Itatira	1	braço
54	M	18	3 meses	Crato	1	face
55	F	19	1 mês e 2 sem	Itatina	1	perna
56	M	15	1 mês	Fortaleza	2	face e braço
57	F	40	3 meses	Horizonte	1	braço
58	F	77	1 mês	Itapipoca	1	braço
59	M	36	3 meses	Viçosa	1	perna
60	M	47	5 meses	Itapajé	1	perna
61	F	39	3 semanas	Horizonte	1	axila
62	F	26	2 meses	Itapipoca	1	pé
63	M	29	5 meses	Aquiraz	1	tórax
64	F	20	1 mês	Palmácia	2	coxa
65	M	35	1 mês e 2 sem	Aquiraz	1	perna
66	M	32	2 meses	Horizonte	1	perna
67	M	43	3 meses	Palmácia	1	braço
68	M	34	6 meses	Itapipoca	1	perna
69	M	34	1 mês e 3 sem	Eusébio	1	perna
70	M	11	3 meses	Aratuba	1	braço
71	M	13	4 meses	Caucaia	múltiplas	vários locais
72	M	38	2 meses	Fortaleza	1	braço
73	M	51	5 meses	Morada Nova	3	orelha, abdômen, costas
74	F	52	5 meses	Morada Nova	2	braço e perna
75	M	68	3 meses	Fortaleza	1	perna

**APÊNDICE A - TABELA COM DADOS CLÍNICO -EPIDEMIOLÓGICOS DOS
PARTICIPANTES DO ESTUDO (CONTINUAÇÃO)**

Caso	Gênero	Idade	Tempo de lesão	Município	Nº de lesões	Local das lesões
76	F	53	2 meses	Fortaleza	2	braço
77	M	51	2 meses	Fortaleza	2	perna
78	F	66	4 meses	Maranguape	1	perna

APÊNDICE B - TABELA COM OS DADOS LABORATORIAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO

Caso	Histológico	<i>Press imprint smear</i>	Imuno-histoquímica
1	Positivo	Positivo	Não Realizado
2	Negativo	Positivo	Negativo
3	Negativo	Positivo	Não Realizado
4	Negativo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Positivo	Positivo
6	Negativo	Positivo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Positivo
8	Negativo	Negativo	Positivo
9	Negativo	Negativo	Positivo
10	Negativo	Negativo	Positivo
11	Negativo	Positivo	Positivo
12	Positivo	Positivo	Positivo
13	Positivo	Positivo	Positivo
14	Negativo	Positivo	Positivo
15	Positivo	Positivo	Não Realizado
16	Negativo	Negativo	Positivo
17	Positivo	Positivo	Positivo
18	Positivo	Negativo	Positivo
19	Positivo	Positivo	Positivo
20	Negativo	Negativo	Positivo
21	Negativo	Negativo	Positivo
22	Positivo	Positivo	Positivo
23	Positivo	Positivo	Positivo
24	Positivo	Positivo	Positivo
25	Negativo	Negativo	Positivo
26	Negativo	Negativo	Positivo
27	Positivo	Positivo	Positivo
28	Positivo	Negativo	Positivo
29	Negativo	Positivo	Positivo
30	Positivo	Positivo	Positivo
31	Positivo	Positivo	Positivo
32	Positivo	Positivo	Positivo
33	Negativo	Negativo	Positivo
34	Negativo	Negativo	Positivo
35	Positivo	Positivo	Positivo
36	Positivo	Negativo	Positivo
37	Negativo	Negativo	Positivo
38	Negativo	Negativo	Positivo

APÊNDICE B - TABELA COM OS DADOS LABORATORIAIS DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO (CONTINUAÇÃO)

Caso	Histológico	<i>Press imprint smear</i>	Imuno-histoquímica
39	Negativo	Negativo	Positivo
40	Positivo	Positivo	Positivo
41	Positivo	Positivo	Positivo
42	Positivo	Positivo	Positivo
43	Negativo	Negativo	Positivo
44	Negativo	Negativo	Positivo
45	Negativo	Negativo	Positivo
46	Positivo	Positivo	Positivo
47	Negativo	Negativo	Positivo
48	Negativo	Negativo	Positivo
49	Negativo	Positivo	Positivo
50	Positivo	Positivo	Positivo
51	Positivo	Positivo	Positivo
52	Negativo	Positivo	Positivo
53	Negativo	Positivo	Positivo
54	Positivo	Negativo	Positivo
55	Negativo	Positivo	Não Realizado
56	Negativo	Positivo	Positivo
57	Positivo	Positivo	Positivo
58	Positivo	Positivo	Positivo
59	Positivo	Positivo	Positivo
60	Positivo	Positivo	Positivo
61	Positivo	Positivo	Positivo
62	Negativo	Positivo	Positivo
63	Positivo	Positivo	Positivo
64	Negativo	Negativo	Positivo
65	Negativo	Positivo	Positivo
66	Negativo	Negativo	Positivo
67	Negativo	Negativo	Positivo
68	Positivo	Negativo	Positivo
69	Positivo	Positivo	Positivo
70	Positivo	Positivo	Positivo
71	Negativo	Negativo	Positivo
72	Negativo	Positivo	Positivo
73	Positivo	Positivo	Positivo
74	Negativo	Negativo	Positivo
75	Negativo	Positivo	Não Realizado
76	Negativo	Positivo	Positivo
77	Positivo	Positivo	Positivo
78	Negativo	Negativo	Positivo

ANEXO A - MACRORREGIÕES DO ESTADO DO CEARÁ

