



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-PPGCB
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Contribuição para o conhecimento de aspectos clínicos e
epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em
Pernambuco: avaliação do uso associado de método de coleta não
invasivo e a técnica de PCR, para o diagnóstico da doença.**

MARIA EDILEUZA FELINTO DE BRITO

Recife

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-PPGCB
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA EDILEUZA FELINTO DE BRITO

**Contribuição para o conhecimento de aspectos clínicos e
epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em
Pernambuco: avaliação do uso associado de método de coleta não
invasivo e a técnica de PCR, para o diagnóstico da doença.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, sob a orientação da Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida e coorientação do Prof. Dr. Sinval Pinto Brandão Filho.

Recife

2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Brito, Maria Edileuza Felinto de

Contribuição para o conhecimento de aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco: avaliação do uso associado de método de coleta não invasivo e a técnica de PCR, para o diagnóstico da doença. / Maria Edileuza Felinto de Brito. – Recife: O Autor, 2013.

125 folhas: il.

Orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida

Coorientador: Sinval Pinto Brandão Filho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

1. Leishmaniose tegumentar americana, 2. Diagnóstico, 3. Coleta de amostras I. Almeida, Alzira Maria Paiva de (orient.) II. Brandão Filho, Sinval Pinto (coorient.) III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-107

MARIA EDILEUZA FELINTO DE BRITO

Contribuição para o conhecimento de aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco: avaliação do uso associado de método de coleta não invasivo e a técnica de PCR, para o diagnóstico da doença.

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, sob a orientação da Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida e coorientação do Prof. Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

Aprovada em: 19 de dezembro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida (Orientadora) – CPqAM/ FIOCRUZ/PE

Profa. Dra. Nilma Cintra Leal - CPqAM - FIOCRUZ/PE

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo - CPqAM - FIOCRUZ/PE

Profa. Dra. Ana Maria Aguiar dos Santos - CPqAM - FIOCRUZ/ PE

Profa. Dra. Maria Amélia Maciel - UFPE

Ao meu esposo José Rômulo Corrêa Lima, à minha filha Mariana e minha família, pelo incentivo, apoio, confiança, compreensão, disponibilidade e cumplicidade, a quem dedico com amor e carinho, essa conquista.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha existência e o reconhecimento de que tudo lhe pertence.

À orientadora Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida, pela competência, respeito, profissionalismo e amizade, minha admiração.

Ao orientador Dr. Sinval Pinto Brandão Filho, diretor do CPqAM/FIOCRUZ-PE e coordenador do grupo de leishmaniose, colega de longas caminhadas, onde juntos compartilhamos da construção do Serviço de Referência em Leishmaniose, obrigada pela dedicação, apoio e amizade.

Ao orientador Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, pelo entusiasmo e profissionalismo, peça fundamental para o desenvolvimento desse estudo, meus agradecimentos e amizade.

Ao amigo Cláudio Júlio da Silva, coordenador do Núcleo de Vigilância Saúde e Ambiente em Moreno, referência no estado de PE em Leishmaniose, pela grande contribuição na busca ativa dos casos, pelo esforço e disponibilidade.

Aos pacientes pela disponibilidade e confiança com que permitiram a coleta de amostras biológicas, sem a cooperação dos mesmos não poderia realizar esse estudo.

À técnica de enfermagem Lucinha, do Núcleo de Vigilância de Saúde e Ambiente de Moreno, pessoa essencial na coleta das amostras biológicas, aplicação da medicação e o acompanhamento aos pacientes, meu reconhecimento pelo empenho e dedicação, minha gratidão.

Aos funcionários da Secretaria de Saúde de Moreno, especialmente a José Apolinário da Silva (Edivaldo), que muito batalhou para conduzir os pacientes até ao HUOC.

À Dra. Angela Cristina Rapela Medeiros, dermatologista, pela competência, carinho e paciência na avaliação e assistência aos pacientes e pelas consultas extras, minha gratidão.

À mestra Ana Isabele Freitas de Araújo, responsável pela padronização do teste, com dedicação, determinação, responsabilidade e competência.

À Dra. Sandra Maria de Andrade, pelo profissionalismo, disponibilidade, cumplicidade, amizade, incentivo e confiança, que muito contribuiu para o desenvolvimento desse estudo.

Ao pesquisador Dr. Roberto Pereira Werkhauser, pela amizade, cumplicidade, pelos momentos de descontração, reflexão e discussão, obrigada pela parceria.

À técnica Éricka Lima de Almeida, pela disponibilidade, responsabilidade com quem sempre pude contar em todos os momentos e pela amizade.

Às minhas co-orientandas Joana Lúcia Almeida e Juliana Viana pela participação ativa durante o desenvolvimento desse estudo seus questionamentos e discussões foram muito valiosas.

Ao Dr. Carlos Nogueira chefe da Dermatologia do HUOC, por permitir o atendimento aos pacientes dividindo o espaço no ambulatório e a auxiliar de enfermagem Maria Argenira Sobral, pelo acompanhamento na coleta das biópsias.

Ao Dr. Alexandre Bezerra de Carvalho, pelo convite para ingressar na FIOCRUZ no Departamento de Imunologia do CPqAM, todo meu respeito, apreço e gratidão.

À Dra. Yara de Miranda Gomes a quem devo minha iniciação na carreira científica, onde juntas coordenamos o LIMP e contribuímos para o desenvolvimento do departamento de Imunologia, meu apreço e amizade.

Ao grupo de Leishmaniose: Francisco Gomes, Dr. Filipe Dantas Torres, Dra. Luciana Figueredo, Kamila, Rayana, Suênia, Kildman, Rômulo, Ana Waléria, Pietra, Vanessa, Fernando, Hélio, Assis, Hailton, Amilton, Angélica, Luana, Laís e Abilene, pela amizade e respeito, especialmente aos doutorandos José Ferreira Marinho Junior, Edeneide Xavier e Bruna Lima, pela disponibilidade em todos os momentos solicitados demonstrando competência e profissionalismo, minha gratidão e amizade.

Aos colegas, estudantes de pós-graduação, de iniciação científica e terceirizada do Laboratório de Imunoparasitologia (LIMP) do Departamento de Imunologia: Dra. Virgínia Lorena pela colaboração na gerência de qualidade do LIMP, a Dra. Milena Cavalcanti e aos técnicos Mineo, Leonardo e Andrea Silva, pela ajuda, compreensão durante essa jornada, os quais me apoiaram nos momentos solicitados.

A todos que fazem o Departamento de Imunologia, minha gratidão

Às colegas e colaboradoras Dra. Valéria Pereira, Dra. Carolina Aciole, Andresa e Marina, pelo compartilhamento nas pesquisas.

Às colaboradoras Dra. Elisa Cupolillo (IOC-FIOCRUZ) e a Dra. Edna Ishikawa (UFPA), responsáveis pela identificação e caracterização dos isolados de *Leishmania* spp. que estão sempre dispostas a contribuir com nossas pesquisas.

Ao grupo do Fluorim INAMI: Dr. Oscar Malta (DQF-UFPE), Dr. Hermi Felinto (USP), Dra. Maria Claudia França Felinto (IPEN-USP), Dra. Hiro Goto (FMT-USP), Dra. Luiza Campos Reis (FMT-USP) e Dr. Eduardo Sanches (USP), pela colaboração do projeto de pesquisa envolvendo Marcadores Biológicos, meus agradecimentos.

À amiga Aila pela amizade, apoio, ajuda, incentivo e disponibilidade.

Aos professores da pós-graduação especialmente a Profa. Dra. Tereza Cartaxo, pela tranquilidade e sabedoria com que conduziu o corpo docente e discente. A secretária Adenilda pelos cuidados e atenção em todos os momentos necessários.

Aos colegas, pelo respeito, troca de experiências e momentos de descontração, com vocês aprendi que as diferenças fazem o todo e vocês só me acrescentaram.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença complexa com características clínicas e epidemiológicas que podem variar em cada região. Devido ao seu caráter focal é imprescindível a compreensão da dinâmica da doença em nível local assim como a disponibilidade de métodos de diagnóstico efetivos para a implementação de estratégias de controle e prevenção. A definição de caso é feita através de exames clínicos associados aos dados epidemiológicos e exames laboratoriais. O diagnóstico clínico da LTA é difícil, por assemelhar-se a outras doenças dermatológicas. A confirmação laboratorial baseia-se em análises parasitológicas, imunológicas e moleculares. Um dos pontos críticos do diagnóstico é a coleta das amostras para análise, que emprega métodos invasivos, de difícil operacionalização e desconfortáveis para os pacientes. O estudo propõe avaliar um método de coleta de amostras não invasivo em pacientes de área endêmica em Pernambuco, Brasil para o diagnóstico da LTA. A análise da literatura mostra que a doença é endêmica em todas as regiões geográficas do Estado com maior prevalência na Mata Atlântica ocorrendo surtos esporádicos ocasionais nessa região e no Agreste, disseminando-se para outras áreas e com o aumento da incidência em todo o estado; o principal agente etiológico da LTA em Pernambuco é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*; diversas espécies de flebotomíneos vetores são amplamente distribuídas em todo o território do estado, predominando *Lutzomyia whitmani* no intra e peridomicílio e *L. complexa*, *L. choti* e *L. sordelli* em remanescentes florestais; roedores silvestres e comensais participam no ciclo de manutenção e transmissão da LTA em Pernambuco. De transmissão vetorial, a LTA também pode ser adquirida como acidente ocupacional pela contaminação com material das lesões dos pacientes e manejo de animais e/ou cultura no laboratório. Dois casos de acidentes ocupacionais por *Leishmania* spp. foram diagnosticados através de PCR a partir de amostras coletadas por *swab*, método não invasivo. Estas ocorrências comprovam o potencial de risco em ambiente de laboratório e campo, com a necessidade de rígidos procedimentos de biossegurança nas rotinas diárias. Comparando os resultados das análises em amostras de material de lesões cutâneas de pacientes foi observado que apesar de considerado padrão ouro, apenas 70,6% dos pacientes foram positivos pelo método direto. Pela técnica de PCR tendo como alvo kDNA de minicírculos de *Leishmania (Viannia)* foi observada uma positividade de 79,5%. A análise estatística para comparação do desempenho das técnicas de coleta de amostras pareadas por *swab* e biópsia para o diagnóstico da LTA por PCR revelou que a coleta por *swab* é uma alternativa válida. Os resultados permitem concluir que pela simplicidade da coleta de amostra por *swab*, associada à alta sensibilidade e especificidade da PCR, o procedimento constitui uma importante contribuição para aperfeiçoamento do diagnóstico e para o sucesso do controle da LTA em áreas endêmicas.

Palavras chaves: Leishmaniose tegumentar americana. Diagnóstico. Coleta de amostras. *Swab*. Biópsia. PCR.

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a complex disease with clinical and epidemiological characteristics that may vary in each region. As a focal disease, understanding its dynamics at local level, as well as, the availability of effective diagnostic methods, is essential for control and prevention strategies. Case definition bases on clinical features associated with epidemiological data and laboratory tests. ACL clinical diagnosis is difficult, due to the resemblance with other dermatological diseases. Laboratory diagnosis employs parasitological, immunological or molecular analyzes. One of the diagnosis weaknesses is the lesion samples collection for analysis, usually performed using invasive methods, of difficult performance and jeopardizes the patients. The study proposes to evaluate a non-invasive samples collection method to employ on ACL diagnosis in patients from endemic areas in Pernambuco state, Brazil. The literature shows that the disease is endemic in all geographic regions of the state with higher prevalence in the Atlantic Forest region and occasional sporadic outbreaks occurring there and in the “Agreste” region. Furthermore, the disease is spreading to other areas and its incidence is increasing throughout the state. The main etiological agent of ACL in Pernambuco is *Leishmania (Viannia) braziliensis*; several species of sandflies vectors are distributed throughout the territory of the state, mainly *Lutzomyia whitmani* found indoor and outdoor premises and *L. complex*, *L. choti* and *L. sordelli* in forest remnants; wild and commensal rodents are involved in the maintenance and transmission cycle of ACL in Pernambuco. Although a vector borne disease, ACL can also be acquired through occupational accident by contamination handling patients' lesion material and animals and / or culture management in the laboratory. Two cases of occupational accidents by *Leishmania* spp. were diagnosed by PCR from samples collected by *swab*, a non-invasive method. These occurrences confirm the potential risk in laboratory and field activities and the need of strict biosecurity procedures in daily routines. Comparing results of analyzes of samples from patients skin lesions, although considered the gold standard, only 70.6 % of patients were positive by the direct parasitological method while PCR targeting *Leishmania (Viannia)* kDNA minicircles achieved 79.5 % positivity. Statistical analysis for comparison of PCR performance on paired samples collected by *swab* and by biopsy revealed that the *swab* collection method is an effective alternative for ACL diagnosis. Concluding, the results indicate that considering the simplicity of sample collection by *swab*, associated with PCR high sensitivity and specificity, the procedure is valuable for ACL diagnosis and will contribute for improving the disease control in endemic areas.

Key words: American cutaneous leishmaniasis. Diagnostic. Sample collection. *Swab*. Biopsy. PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	Distribuição dos casos de leishmaniose tegumentar americana notificados no Brasil: 2002-2012	21
Gráfico 2	Distribuição dos casos de leishmaniose tegumentar americana notificados no estado de Pernambuco: 2002-2012	22
Figura 1	Formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana (A) Leishmaniose cutânea localizada. (B) Leishmaniose recidiva cutis. (C) Leishmaniose cutânea disseminada, (D) Leishmaniose cutânea difusa	26
Figura 2	Forma clínica da leishmaniose tegumentar americana. Leishmaniose Mucosa	27
Figura 3	<i>Punch</i> utilizado na coleta de amostras invasivas na rotina de laboratório	29
Figura 4	Coleta de amostras utilizadas na rotina laboratorial para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana	30
Figura 5	Coleta de amostra não invasiva por <i>swab</i> utilizada no estudo	32
Figura 6	Esquema de métodos de diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana	37
Figura 7	Parâmetros de teste de validação	40

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

Figura 1	Mapa da diversidade de zimodemas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> em três municípios da Região Metropolitana de Recife (Moreno), Zona da Mata Sul (Amaraji), Zona da Mata Norte (Paudalho) de Pernambuco. RMR: Região Metropolitana de Recife ZM: Zona da Mata; A: Agreste; S: Sertão; SSF: Sertão do São Francisco.	57
Figura 2	Evolução das lesões dos pacientes antes e após tratamento	62
Figura 3	Coleta de exsudatos cutâneos através de swab (A e B)	81
Figura 4	Eletroforese em gel de agarose a 1 % corado pelo brometo de etídeo, mostrando produtos de PCR de amostras de swab e biópsias amplificadas a partir de iniciadores específicos para o subgênero <i>Viannia</i>	81

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

Tabela 1	Comparação dos resultados da PCR em amostras coletadas por biópsia e <i>swab</i>	82
Tabela 2	Distribuição dos resultados da PCR a partir das amostras pareadas coletadas por <i>Swab</i> e por Biópsia nos diferentes tipos das lesões dos pacientes	91
Tabela 3	Resultados dos diferentes testes diagnósticos (exame direto, PCR, IDRM, RIFI, cultura in vitro e cultura in vivo de pacientes oriundos de área endêmica para LTA em PE	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEP	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
dNTPs	Deoxuribonucleotide triphosphates (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados)
E	Especificidade
EC	Escova citológica
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido etileno diamino tetracético)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FC-AFPA	Citometria de Fluxo para detecção de anticorpos de formas fixas de <i>Leishmania</i>
FC-ALPA	Citometria de Fluxo para detecção de anticorpos de formas livres de <i>Leishmania</i>
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
FPLI	Impressão da Lesão em Papel de Filtro
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Human Immunodeficiency Virus
Hsp70	Heat-shock proteína 70
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IgG	Antimunoglobulina G
KCl	Cloreto de potássio
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto de tripanosomatídeos
LACEN	Laboratório Central
L.	Gênero <i>Leishmania</i>
(L.)	Subgênero <i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada

LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LT	Leishmaniose Tegumentar
LRC	Leishmaniose Recidiva Cútis
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MLEE	Multi-Locus Enzyme Electrophoresis (Análise de isoenzimas por eletroforese)
MgCl₂	Cloreto de magnésio
MS	Ministério da Saúde
mkDNA	Minicírculo do DNA do cinenoplasto
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PD	Pesquisa direta
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real)
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> (Dodecil Sulfato de Sódio - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)
S	Sensibilidade
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo
(V.)	Subgênero <i>Viannia</i> spp.
TAE	Tris-acetato
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UPE	Universidade de Pernambuco
USA	United States of America (Estados Unidos da América)
W blot	Western blotting

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS	x
LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
CAPÍTULO I	20
4 REVISÃO DA LITERATURA	21
Características gerais da LTA	21
Modo de transmissão	22
Aspectos clínicas	24
Diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial da LTA	27
Métodos de coleta de amostras	28
Coletas invasivas	28
Coletas não invasivas	30
Exames para o diagnóstico da LTA	33
Pesquisa direta do parasito	33
Exames imunológicos	34
Métodos moleculares	35
Características moleculares da <i>Leishmania</i>	36
Avaliação de testes de diagnósticos	38
5 REFERENCIA S BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO II	53

ARTIGO 1 – Cutaneous Leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco	54
CAPÍTULO III	61
ARTIGO 2 – Occupationally acquired American cutaneous leishmaniasis	62
CAPÍTULO IV	67
ARTIGO 3 - Sample collection by cotton swab, a safe non-invasive procedure for American cutaneous leishmaniasis diagnosis.	68
CAPÍTULO V	83
ARTIGO 4 – Avaliação de diferentes métodos para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.	84
CONCLUSÕES	100
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Paciente)	101
APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Controle)	102
APÊNDICE C – Ficha clínica do paciente	103
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do CPqAM/FIOCRUZ-PE	104
ANEXO B - Comprovação de submissão do Artigo 3	105
ANEXO C – Normas da revista Experimental Parasitology	106
ANEXO D – Normas da revista PloS One	118

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão no quadro das protozoonoses heteróxeas com alta prevalência em regiões tropicais e subtropicais. São parasitoses complexas que apresentam duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (LV) mais agressiva que se não tratada é fatal, e a leishmaniose tegumentar (LT), denominada no Brasil leishmaniose tegumentar americana (LTA). A gravidade dessas formas clínicas varia de acordo com os agentes etiológicos, estado imunológico do paciente, manifestações clínicas, evolução da doença e resposta ao tratamento. Com a urbanização e expansão dessas patologias faz-se necessário o aperfeiçoamento de um diagnóstico diferencial, precoce, efetivo e mais sensível.

Os métodos clássicos disponíveis para o diagnóstico da LTA não apresentam a eficácia e aplicabilidade desejadas. Sendo assim, é necessário avaliar a história epidemiológica (procedência), social (hábitos e profissão), aspectos clínicos (sinais e sintomas) e a confirmação laboratorial dos casos o que pode ser realizado através dos métodos parasitológicos (exame direto e cultura), imunológicos (Intradermoreação de Montenegro - IDRM, reação de imunofluorescência indireta - RIFI, testes imunoenzimáticos (Enzyme linked immunosorbent assay-ELISA) e *Western blotting* (W. blot) e moleculares.

Entre os métodos moleculares desenvolvidos com alta sensibilidade, especificidade e rapidez dos resultados, a reação em cadeia da polimerase (PCR) vem sendo aplicada no diagnóstico da LTA. A PCR permite a identificação de espécies de *Leishmania* em casos sub clínicos da doença, e/ou de baixa carga parasitária, o acompanhamento do tratamento e distinção entre infecções ativas e passadas. Apresenta-se como uma ferramenta muito valiosa para esse grupo. Em geral é precedida de uma biópsia para obtenção do material biológico, alvo da análise, porém existe o incômodo ao paciente inerente à retirada de tecido, gerando em algumas ocasiões, um processo inflamatório. Por outro lado, como a coleta ocorre, apenas, em determinado ponto da borda lesionada, não se assegura que neste local existam parasitos disponíveis.

Neste contexto, a utilização de um procedimento não invasivo assume grande importância para o diagnóstico. A coleta de amostras utilizando *swab* de algodão é um procedimento prático, rápido e não invasivo, não acarreta incômodo ao paciente, pois o contato com a área lesionada durante a coleta de material é sutil e praticamente livre de risco de causar infecção bacteriana. O presente estudo propõe contribuir com os aspectos clínicos, epidemiológicos da LTA em Pernambuco e avaliar o desempenho do método de coleta de

amostras de lesões de pacientes utilizando *swab* em associação à técnica diagnóstica de PCR objetivando segurança adequada e precisão no diagnóstico da doença.

2 JUSTIFICATIVA

As áreas de ocorrência da LTA estão em expansão, em consequência principalmente das modificações ambientais provocadas pelo homem, aos deslocamentos populacionais originados de áreas endêmicas e à insuficiente infra-estrutura da rede de assistência e vigilância em saúde. Rotineiramente, o diagnóstico laboratorial da LTA emprega procedimentos invasivos para coleta de amostras que podem apresentar riscos de infecção secundária ao paciente e dificuldade operacional. A biópsia da borda da lesão é realizada apenas por profissional médico em ambientes especialmente preparados para execução da técnica. Além disso, esse tipo de coleta pode ser mais difícil em crianças e em lesões de certas áreas do corpo (ex. pálpebras, cartilagens do pavilhão auricular).

Assim, o caráter grave e crônico da doença justifica o desenvolvimento de um método não invasivo para coleta de amostras para o diagnóstico, que proporcione o mínimo incômodo ao paciente e não apresente riscos de infecção no local. Apesar da diversidade de métodos de coleta de amostras, procedimentos não invasivos ainda não foram validados para o diagnóstico da LTA. A ausência de validação desses métodos vem impossibilitando a implementação dos mesmos nas rotinas de diagnóstico laboratorial da doença em serviços públicos de saúde. O método proposto no nosso estudo permite a realização da coleta de amostras de maneira simples por um técnico qualificado de nível médio, e viabiliza o procedimento em locais de difícil acesso aos serviços de saúde.

A proposta não pretende substituir a coleta de amostras por biópsia para o diagnóstico da LT, mas introduzir a coleta com *swab* como método de coleta de amostra associada ao diagnóstico por PCR, que confere sensibilidade e especificidade na identificação do parasita. Trata-se de uma pesquisa relacionada à inovação tecnológica que poderá trazer benefícios substanciais aos pacientes. O método desenvolvido poderá ser incorporado na rotina do Serviço de Referência em Leishmaniose do CPqAM/FIOCRUZ-PE e repassado para os laboratórios da rede do Ministério da Saúde (MS): os Laboratórios Centrais (LACEN), e demais serviços de saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Contribuir para o conhecimento de aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco e, avaliar o uso associado de método de coleta não invasivo e a técnica de PCR, para o diagnóstico da doença.

3.2 ESPECÍFICOS:

- Expor o estado da arte do conhecimento acumulado sobre os aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco;
- Avaliar o método de coleta, por *swab*, de amostras de lesões cutâneas de pacientes para diagnóstico da LTA por PCR;
- Estimar a concordância do emprego de PCR para o diagnóstico da LTA, considerando o uso dessa técnica associada aos métodos de coleta por *swab* e biópsia;
- Comparar a sensibilidade e a especificidade entre a PCR em amostras coletadas por *swab* e exame direto.

CAPÍTULO I

4 REVISÃO DA LITERATURA

Características gerais da LTA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária, não contagiosa, causada por protozoário do gênero *Leishmania*, de transmissão vetorial, que acomete pele e mucosa. Considerada antes, uma zoonose entre animais silvestres também afeta o homem e outros animais em ambientes domiciliar e peridomiciliar (AGUILAR et al., 1989; BARBOSA-SANTOS et al., 1994; LAISON et al., 1994).

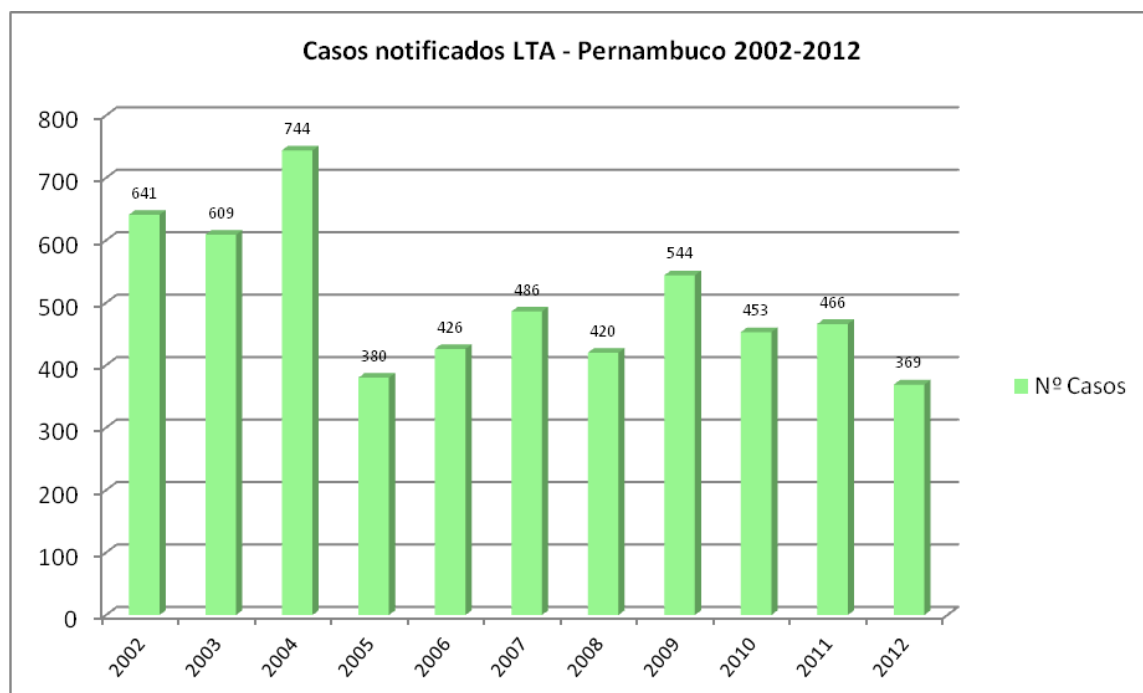
É uma doença transmissível com quadro de persistência, em função das altas prevalências, ampla distribuição geográfica e potencial para evoluir para formas graves e mutilantes (WHO, 2012). No Brasil, foram registrados 259.738 casos no período de 2002 a 2012 (Gráfico 1), e no Estado de Pernambuco 5.538 casos (Gráfico 2), no mesmo período (SINAN, 2013).

Gráfico 1. Distribuição dos casos notificados da leishmaniose tegumentar americana no Brasil no período de 2002 a 2012.



Fonte: SINAN, 2013

Gráfico 2. Distribuição dos casos notificados da leishmaniose tegumentar americana no estado de Pernambuco, no período de 2002 a 2012.



Fonte: SINAN, 2013

Modo de transmissão da LTA

Atualmente são reconhecidas nas Américas, 14 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas, somente em animais. No Brasil foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW 1987;1972).

As principais espécies implicadas como agentes etiológicos de LTA no Brasil são *Leishmania* (L.) *amazonensis* (LAINSON; SHAW et al., 1972), *L. (V.) guyanensis* (FLOCH 1954) e *L. (V.) braziliensis* (VIANNA, 1911). Outras espécies recentemente descritas como *L. (V.) lainsoni* (SILVEIRA et al., 1987; 1991), *L. (V.) naiffi* (NAIFF; FREITAS; ARIAS, 1989), *L. (V.) shawi* (SHAW et al., 1991) e *L. (V.) lindenbergi*, também são responsáveis pelos casos de LTA no país (SILVEIRA et al., 2002).

A *L. (V.) braziliensis* tem ampla distribuição no Brasil, desde o norte ao sul, tanto em áreas de colonizações antigas como recentes, estando associada à presença de animais domésticos e é transmitida por diversas espécies de flebotomíneos (LAINSON; SHAW, 1987). A LTA causada por essa espécie é frequentemente encontrada em zonas de cultivo de cana-de-açúcar, cacau e banana. Em geral, a transmissão vincula-se com atividades profissionais

realizadas nestas regiões. Uma incidência significativa em crianças sugere que parte da transmissão ocorre no peridomicílio (BRANDÃO et al., 1999). Esta infecção é frequentemente contraída em terra firme, causa lesões cutâneas (raramente múltiplas) expansivas e persistentes, com tendência a produzir metástases em mucosa nasal, atingindo cerca de 3 a 5% dos casos (GOTO; LINDOSO, 2010). A enfermidade é conhecida por várias denominações: "úlcer de Bauru", leishmaniose cutâneo-mucosa, espúndia e ferida brava (LAINSON; SHAW, 1987; 1998).

São considerados reservatórios da LTA as espécies de animais que garantam a circulação de *Leishmania* spp. na natureza, dentro de um recorte de tempo e espaço. Casos de infecção natural por *L. (V.) braziliensis* foram descritos em área endêmica de LTA, em várias regiões do Sudeste e Nordeste do Brasil (AGUILAR et al., 1989), cães (*Canis familiaris*) (MADEIRA et al., 2006; TOLEZANO et al., 2007), e gatos domésticos (*Felis catus*) (DANTAS-TORRES et al., 2006; SAVANI et al., 2004); cavalos (*Equus caballus*), jumentos (*Equus asinus*) (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; YOSHIDA et al., 1990), primatas não humanos (LAINSON; SHAW, 1998; SHAW et al., 1991)

Diversos roedores silvestres e sinantrópicos têm sido relatados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais de *L. (V.) braziliensis*, pertencentes aos gêneros *Akodon* (FORATTINI et al., 1972b), *Proechimys* (LAINSON; SHAW, 1973), *Rattus* [LAINSON; SHAW, 1979; BRANDÃO-FILHO et al., 1994; VASCONCELOS et al., 1994], *Oryzomys* (FORATTINI et al., 1972b; LAINSON; SHAW, 1969; FORATTINI et al., 1973), *Rhipidomys* (LAINSON, R. et al., 1981b), roedores das espécies *Nectomys squamipes* (rato d'água) (BRANDÃO-FILHO et al., 1994) e *Bolomys lasiurus* (rato-do-mato) [BRANDÃO-FILHO et al., 1994], e marsupiais do gênero *Didelphis* (LAINSON; SHAW, 1973).

Brandão-Filho et al. (2003) em estudo longitudinal realizado na Zona da Mata de Pernambuco isolaram pela primeira vez a *L. (V.) braziliensis* por cultura a partir de amostras de baço de roedores, obtendo cinco isolados do parasita em *B. lasiurus* (=3), *N. squamipes* (=1) e *Rattus rattus* (=1). Posteriormente, Lima et al. (2013) corroboraram o envolvimento das espécies *N. squamipes*, *R. rattus* e *Holochilus sciureus* como hospedeiros da *Leishmania* spp. em área de alta endemicidade em Pernambuco.

O ciclo de transmissão do parasito é caracterizado como indireto com a participação de vetores pertencentes à ordem Diptera da subfamília Phlebotominae. As fêmeas da maioria das espécies são hematófagas e são responsáveis pela transmissão dos protozoários que causam a

LTA (FORATTINI 1973). Nas Américas e no Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da doença são *Lutzomyia whitmani*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata*, e *L. migonei*. Em Pernambuco foram identificadas 37 espécies de vetores distribuídas em todo estado, *L. whitmani* com predominância no domicílio e peri domicílio e *L. complexa* em focos de áreas remanescentes (GUIMARÃES et al., 2012; DANTAS-TORRES et al., 2010; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; ANDRADE et al., 2005).

Em ambiente de floresta o ciclo acontece sem a participação humana, caracterizando o foco silvestre, descrito como enzootia. Nos reservatórios silvestres, a infecção em geral é inaparente e benigna. No entanto, o homem e alguns animais domésticos (cães, gatos, equinos e jumentos) são considerados hospedeiros acidentais, quando esses entram em contato com áreas de transmissão de *Leishmania* (AGUILAR et al., 1989; LAINSON; SHAW, 1994).

O ciclo biológico do parasito no hospedeiro vertebrado inicia-se quando a fêmea do flebotomíneo, previamente infectada realiza o repasto sanguíneo, inoculando os parasitos na forma promastigotas. Estes penetram nos macrófagos pela ação da fagocitose, e se transformam na forma amastigota, as quais se multiplicam por divisão binária. A infecção é mantida pelo rompimento da célula infectada, causada pelo excesso de parasitos, que podem ser novamente fagocitados por outras células macrofágicas mais próximas (KILLICK-KENDRICK, 1977; BEACH; KIILU; LEEUWENBURG; 1985).

No hospedeiro invertebrado o ciclo ocorre quando as fêmeas dos flebotomíneos, durante sua alimentação sanguínea, ingerem os macrófagos parasitados encontrados na pele ou no sangue periférico. No tubo digestivo dos insetos, a forma amastigota modifica-se na forma promastigota, que se multiplica por divisão binária e migra para a probóscida, podendo ser transmitida ao vertebrado na próxima alimentação do inseto (AGUIAR 1986).

Aspectos clínicas

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida (LAINSON; SHAW, 1978; WEIGLE; SARAIVA,1996), da relação com o hospedeiro, da constituição genética e imunológica do paciente (BARRAL et al., 1991; REIS et al., 2008), dos vetores e das características epidemiológicas (BRANDÃO-FILHO et al., 1999). As manifestações clínicas abrangem desde formas inaparentes ou lesões de pele que podem evoluir para cura espontânea (COSTA et al., 1992), até formas com ulcerações múltiplas e comprometimento da mucosa, com tendência a recidivas (COUTINHO et al., 1987; PASSOS et al., 2001).

A lesão se desenvolve no local da picada do inseto vetor em áreas expostas na pele do hospedeiro. Após duas semanas a três meses de incubação, surge um nódulo ou pápula eritematosa, bem delimitada, às vezes arredondada, que pode evoluir aumentando de tamanho acompanhado ou não de adenite regional (MARZOCHI, 1992; COSTA et al., 2009). A lesão pode ser única ou múltipla, e mucosa.

A forma mais prevalente é a cutânea localizada (LCL) caracterizada pela presença de lesão exclusivamente na pele em áreas expostas do corpo (Figura 1A). A lesão é geralmente única, mas pode ocorrer várias (1-10), de tamanho variado, apresentando em geral bordos elevados, tipo moldura, fundo granulomatoso, com ou sem exsudato (COSTA et al., 2009; GOTO; LINDOSO 2012). A LCL apresenta tendência à cura e boa resposta ao tratamento (MARZOCHI, 1992).

Outras formas menos frequentes são as formas impetigóide, liquenóide, tuberculosa ou lupóide, nodular, vegetante, e ectimatóide (MARSDEN, 1986; SAMPAIO; RIVITT, 1998).

A forma recidiva cútis (LRC) caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões satélites próximo a parte lisa da lesão primária ou cicatriz (Figura 1B) após tratamento (COSTA et al., 2009) e está relacionada à imunidade inerente ao hospedeiro, e/ou a persistência parasitária nas afecções por *L. braziliensis*, onde só há cura clínica, mas não parasitária (SCHUBATH et al., 1998; MENDONÇA et al., 2004).

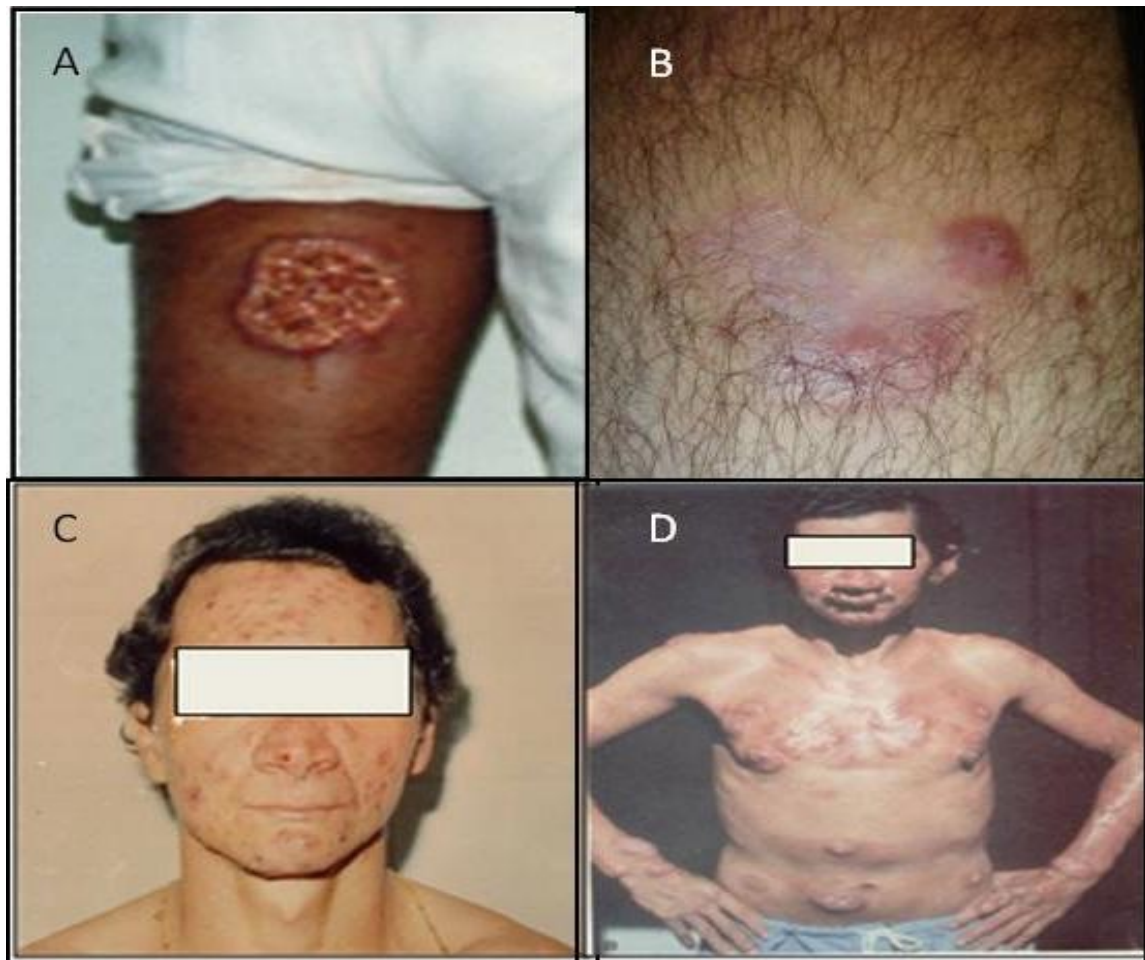
A leishmaniose disseminada (LD) caracteriza-se pelo aparecimento de múltiplas (>10 lesões) lesões papulares de aparência acneiforme por várias regiões do corpo, especialmente face e tronco (Figura 1C); ocorre posteriormente à lesão primária, provavelmente por disseminação dos parasitos, via hemática ou linfática. A LD responde ao tratamento com antimoniato (COSTA et al., 1986; MARZOCHI, 1992; TURETZ; MACHADO; KO, 2006).

A forma cutânea difusa (LCD) é uma manifestação rara, caracterizada por lesões nodulares, distribuídas na pele, ricas em parasitos (Figura 1D). Ocorre em indivíduos com deficiência imunológica; é de evolução crônica e sem resposta ao tratamento (CONVIT, KERDEL-VEGAS, GORDON, 1962; MARZOCHI, 1992; BARRAL et al., 1995; DESJEUX, 2004; COSTA et al., 2009).

Outra apresentação é o acometimento mucoso que na sua maioria advém das formas cutâneas podendo ocorrer simultaneamente (MARZOCHI, 1992). Estima-se que 3 a 5% dos casos de leishmaniose mucosa (LM) ocorrem após meses ou anos da LC. Compreende as formas

infiltrativas iniciais, ulcerosa, vegetantes e úlcero-vegetante (Figura 2). Acomete a região nasofaríngea, laringe e cavidade oral, está relacionada de forma predominante com a *L. braziliensis* (MARSDEN 1994). Essa forma é de natureza metastática que pode ou não acompanhar os quadros cutâneos, o que dificulta o diagnóstico no início da doença (GOTO; LINDOSO, 2010).

Figura 1. Fomas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.



Legenda: (A) Leishmaniose cutânea localizada. (B) Leishmaniose recidiva cútis. (C) Leishmaniose cutânea disseminada. (D) Leishmaniose cutânea difusa.

Fonte: Brito, M.E.F. (A, e C), 2000; (B) 2012; Manual de LTA (D).

Figura 2. Forma clínica da leishmaniose.



Legenda: Leishmaniose mucosa

Fonte: Brito, M.E.F. (2013).

Diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial da LTA

Classicamente o diagnóstico da doença está fundamentado em provas laboratoriais associadas a evidências clínicas e epidemiológicas. O diagnóstico definitivo requer a demonstração do parasito, às vezes de difícil visualização, quando existem poucos parasitos na lesão (GRIMALDI JR; TESH, 1993).

O diagnóstico clínico pode ser feito com base nos sinais e sintomas de diferentes formas de lesões da LTA, que são confusos e frequentemente assemelham-se aos de outras doenças dermatológicas. As formas tegumentares dependem de alguns fatores como a espécie de *Leishmania* envolvida e a relação do parasito com seu hospedeiro (SARAIVA et al., 1989). A LTA produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato devendo ser diferenciada de outras doenças dermatológicas (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARZOCHI, 1992).

O diagnóstico epidemiológico baseia-se nas informações relacionados às atividades ocupacionais dos pacientes, procedência, residências anteriores e viagens a locais endêmicos para LTA (BRITO et al., 2008). Essas informações podem fornecer elementos importantes para elucidação diagnóstica (MARZOCHI, 1992; BRASIL, 2007).

O diagnóstico laboratorial consiste na identificação direta do parasito pela visualização microscópica das formas amastigotas em material obtido da borda da lesão por escarificação, aspiração ou *imprint* de biópsia em lâminas coradas por Giemsa, Leishman ou Panótico (KAR, 1995) e muitas vezes apresentam dificuldades, principalmente nos casos mais antigos, devido à

escassez de parasitos nas lesões (MARZOCHI, 1992), tendo em alguns casos, a resposta terapêutica específica incluída no diagnóstico da doença (KAR, 1995).

Métodos de coleta de amostras

A coleta de amostras das lesões para diagnóstico é realizada de diversas maneiras, mais frequentemente empregando métodos invasivos, mas também se pode recorrer a métodos não invasivos.

Coletas invasivas

Classicamente a coleta de material para diagnóstico é realizada através dos seguintes procedimentos:

Escarificação - realizada com auxílio de lâmina de bisturi estéril executando movimentos de raspagem na borda das lesões, previamente tratadas antissepticamente com solução salina estéril (0,9 %) (Figura 4 - A). Com o material retirado faz-se esfregaço em lâmina de microscopia (BRASIL, 2007).

Punção aspirativa da borda da lesão - realizada pela introdução de 0,3 mL de salina estéril através de seringa de 5 mL e agulha de 25x8G e aspiração (Figura 4 - B). O material aspirado é inoculado em meio de cultivo ou em animal de laboratório (*hamster* = *Mesocricetus auratus*), e feitos esfregaços em lâminas (MARZOCHI, 1992; ROMERO et al., 1999; BRASIL, 2007).

Biópsias cutâneas - são realizadas através de *punch* de 2-8 mm de diâmetro (Figura 3). Os fragmentos são retirados da borda da lesão, após antisepsia com clorexidina e infiltração anestésica local com lidocaína (2 %), sob condições estéreis. Todos os procedimentos de obtenção de biópsia são realizados por profissional médico em ambiente ambulatorial e as amostras são acondicionadas a - 70 °C (Figura 4 - C).

A retirada de fragmentos de tecido pode ainda ser feita utilizando lâminas de bisturi, tesoura cirúrgica, palito de madeira, *shaving* (SAMPAIO et al., 2002). A amostra coletada servirá para a confecção de *imprint* em lâminas pela aposição do material, cortes histológicos, inoculação em meio de cultura ou em hamster (NAVIN, 1990). Este procedimento deve ser praticado em lesões íntegras, sem infecções secundárias por fungos e/ou bactérias e que não tenham sido tratadas. A biópsia deve ser feita em lesões recentes e não traumatizadas (ALVES et al., 2011).

Figura 3 - *Punch* utilizado na coleta de amostras por biópsia.



Fonte: www.fotosearch.com.br/fotos-imagens/punch.html

A biópsia constitui o principal recurso para obtenção de amostras para detecção do DNA do parasito de lesões cutânea e mucosa através da reação em cadeia da polimerase (PCR), para o diagnóstico da LTA (RODRIGUES et al., 2002). Embora esse método seja empregado na rotina diagnóstica possui vários inconvenientes tais como: causa desconforto ao paciente, apresenta riscos de sangramento no local, necessitando de uma sutura, não é recomendado em pacientes com deficiência de coagulação; apresenta dificuldade em áreas sensíveis de localização das lesões, na realização em crianças, e é feito exclusivamente por profissionais de saúde especializados (MANOCHA; BANSAL; FARAH, 2011).

Amostra de sangue - coletada por punção intravenosa com seringa de 5 mL, agulha 25 x 7G e após a coagulação do sangue, o soro é separado por centrifugação e acondicionado a -20°C (Figura 4 – D), que podem ser utilizadas para testes imunológicos e moleculares para o diagnóstico da LTA (KAR, 1995; RODRIGUES et al., 2002).

Figura 4 - Métodos de coleta de amostras biológicas utilizadas na rotina laboratorial para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana.



Legenda: (A) Escarificação com lâmina de bisturi. (B) Punção aspirativa da borda da lesão. (C) Biópsia da borda da lesão (D) Coleta de sangue intravenosa.

Fonte: Brito, M.E.F. (2000).

Coletas não invasivas

Diante da inconveniência dos métodos invasivos tem-se buscado o desenvolvimento de métodos não invasivos para coleta de material de lesões, que sejam simples, práticos, de menor desconforto para o paciente, além de seguros, eliminando a utilização de materiais perfuro – cortantes (MIMORI et al., 2002; GARCIA et al., 2007; STRAUSS-AYALI et al., 2004; FIGUEROA et al., 2009; BOGGILD et al., 2011; VALENCIA et al., 2012; LOMBARDO et al., 2012;).

Exsudatos da superfície das lesões ulceradas podem ser coletados com auxílio de *swabs* de algodão estéreis. O *swab* é movimentado em “zig-zag” sobre a superfície da lesão de maneira que todo o exsudato da superfície da lesão seja impregnado no algodão (centro e borda) (Figura 5). Para coleta em lesões sem exsudatos, utiliza-se o *swab* impregnado com solução salina estéril (0,9 %). Lesões crostosas, especialmente as consequentes de infecções secundárias, podem ser lavadas com solução salina estéril, depois se retira uma pequena parte da superfície crostosa, preferencialmente da borda, com auxílio de gaze umedecida e em seguida realiza-se a coleta dos exsudatos da área exposta.

O uso de *swabs* de algodão (cotonetes estéreis) foi descrito pela primeira vez como um método não invasivo para obtenção de exsudato de lesões ulceradas em pacientes em áreas endêmicas para LTA no Equador (MIMORI et al., 2002). O método foi considerado pelos autores uma melhor alternativa de coleta não invasiva de amostras para diagnóstico por PCR. Entretanto nesse procedimento é utilizada uma lâmina de bisturi para romper a crosta ressecada da lesão a fim de coletar os exsudatos, sendo então este procedimento tipicamente invasivo.

Figuerola et al., (2009) relataram a coleta de amostras de exsudatos de mucosa nasal, amígdala e conjuntiva de pacientes de leishmaniose cutânea e mucocutânea utilizando *swabs* e as análises confirmaram a infecção por *L. panamensis*, *L. guyannensis* e *L. braziliensis*.

Boggild et al., (2011) realizaram um estudo comparativo utilizando a técnica de PCR para diagnóstico de LM em pacientes em Lima (Peru), a partir de amostras obtidas por procedimentos invasivos (amostras de biópsia de pele) e não invasivo (amostras obtidas através de escova citológica comercial) observaram que o uso da escova citológica comercial tem como vantagens a rapidez, boa aceitação pelos pacientes e não oferece os riscos dos procedimentos invasivos.

Esses mesmos autores (BOGGILD et al, 2011a) avaliaram o desempenho da coleta não invasiva, por impressão de lesões ulceradas e nodulares da LTA em impressão da lesão em papel de filtro (FPLI) e relataram melhores resultados em lesões ulceradas sem infecções secundárias e a necessidade de tratamento prévio das lesões que apresentarem infecções.

A comparação do desempenho da coleta de amostras em pacientes atendidos no Hospital Nacional Cayetano Heredia, Peru, através de FPLI e escova citológica (não invasivos) e do raspado (invasivo) da borda da lesão da LTA revelou que os métodos não invasivos prestam-se como métodos de coleta alternativos. O FPLI mostrou-se rápido e bem tolerado, com potencial de ser utilizado no campo e em populações pediátricas (VALENCIA et al., 2012).

Garcia et al. (2007) descreveram a utilização de palitos de madeira estéreis para a coleta de pequenos fragmentos superficiais de tecido cutâneo de lesões de LTA em um estudo desenvolvido em 44 pacientes da Bolívia através da técnica de RFLP *restriction fragment lenght polymorphism* dirigida para a proteína hsp70 (heat-shock protein 70). Os testes apresentaram 95% de sensibilidade e 100% de especificidade. Apesar de ser considerada não invasiva, tal prática pode oferecer riscos, pela utilização de material com as extremidades pontiagudas.

A detecção do agente causador da leishmaniose visceral humana (LV) em amostras coletadas por *swabs* de secreções nasais e orais foi relatada inicialmente em 1934 por Forkner.

Posteriormente, um estudo no Hospital Veterinário da Universidade de Jerusalém foram avaliadas e comparadas amostras obtidas por *swab* da conjuntiva de cães, com amostras obtidas por métodos invasivos, inclusive biópsia de tecido canino e o método de coleta não invasivo (*swab*) que se revelou uma alternativa para os estudos epidemiológicos no diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) (STRAUSS-AYALI et al., 2004).

A avaliação do potencial da coleta não invasiva de amostras clínicas, por *swab* conjuntival, nasal, oral, e pele de orelha para o diagnóstico molecular da LVC, utilizando a PCR convencional, e a PCR em tempo real (qPCR) para verificar a carga parasitária, (FERREIRA et al., 2008; 2012) revelou o bom desempenho por ambas as técnicas, a partir do *swab* conjuntival de cães assintomáticos e constatou que este procedimento pode ser utilizado para diagnóstico em cães sem expressão clínica (LEITE et al., 2010). A coleta não invasiva por *swab* conjuntival também se mostrou um método sensível e prático em um estudo em um grupo de cães vacinados contra LVC permitindo a detecção por PCR do DNA de *Leishmania* spp. (LEITE et al., 2011).

Através das análises imunológicas por citometria de fluxo em amostras de sangue e aspirados de linfonodos de cães das províncias da Caltanissetta, Palermo, Messina, Catania e Sicília, na Itália e amostras de *swab* oral e conjuntival foi considerado que a coleta não invasiva pode ser um método alternativo para detecção de *L. infantum* em cães e que o procedimento pode auxiliar no diagnóstico da LV em cães pela facilidade de coleta, rapidez e maior conforto aos animais (LOMBARDO et al., 2012).

Figura 5 - Método de coleta não invasivo



Legenda: Coleta de amostra não invasiva por *swab* utilizada no estudo.

Fonte: Brito MEF (2010).

Exames para o diagnóstico da LTA

Pesquisa direta do parasito

Pesquisa direta - A visualização do parasito por microscopia ótica em esfregaços de material das lesões é o padrão-ouro para o diagnóstico em todas as formas de leishmaniose. É um procedimento rápido, de baixo custo e de fácil execução, contudo, apresenta limitações, pois não permite distinguir espécies de *Leishmania* e possui baixa sensibilidade (50-79%). Nos casos de LTA por *L. (V.) braziliensis* a escassez de parasitos, aumenta a probabilidade de resultados falso-negativo e a positividade é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença (BENSOUSSAN et al, 2006; MARZOCHI, 1992), exceto em pacientes que apresentam a forma difusa, pois neste caso os nódulos presentes na pele são ricos em parasitos (CUBA et al., 1981; 1986). Na LTA a detecção das formas amastigotas pode também ser feita por técnicas imunocitoquímicas em tecidos de lesão e em *imprints* de tecido ou aspirado de lesão em membrana de nitrocelulose (SALINAS et al., 1989).

Análise histopatológica - permite o diagnóstico da LTA, e é de grande utilidade no diagnóstico diferencial de processos ulcerativos indefinidos, especialmente para neoplasias (BADARÓ; DUARTE, 2005), entretanto apresenta limitações no diagnóstico da LTA, devido à baixa sensibilidade, por apresentar resultados semelhantes aos de outras doenças dermatológicas, de característica inflamatória e/ou granulomatosa. O diagnóstico histopatológico de certeza depende da identificação do parasito nos tecidos (WEIGLE et al., 1987).

Isolamento e cultivo do parasito - o isolamento de promastigotas pelo cultivo em meio de cultura de fragmentos de material obtido através de biópsias e aspirados da borda de lesões é de grande importância por ser altamente específico. Além da confirmação do agente etiológico permite a identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas (BARRAL et al., 1987; ROMERO et al., 1999). O método apresenta limitações do ponto de vista técnico: baixa sensibilidade em relação às diferentes espécies de *Leishmania*, em torno de 50% para *L. (V.) braziliensis* e de fácil contaminação. Esse procedimento exige laboratórios com infraestrutura e pessoal qualificados, o que torna inadequado para inquéritos epidemiológicos em larga escala (BRASIL 2007; BENSOUSSAN et al., 2006; RODRIGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2006).

Outra forma de cultivo é a inoculação de material obtido das úlceras cutâneas por punção e/ou biópsias em animais experimentais, sendo o hamster (*Mesocricetus auratus*) o mais susceptível. Apesar de ser um método importante para a recuperação de parasitos (WEIGLE et al., 1987) necessita-se em média de dois a nove meses para a reprodução da lesão no modelo

animal e a eficácia do isolamento depende da espécie de *Leishmania* envolvida, podendo variar de 13 a 90% (CUBA; MARDSEN; BARRETO, 1981; WEIGLE et al., 1987; NAVIN; ARANA; MERIDA, 1990), portanto, é inadequado em rastreamento epidemiológico em grande escala, além de não ser de utilidade prática para a rotina laboratorial (RODRIGUES, 2002; BENSOUSSAN et al., 2006; BRASIL 2007).

Exames imunológicos

São métodos indiretos que auxiliam no diagnóstico da LTA, dentre esses se destacam a intradermorreação de Montenegro (IDRM), a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste imunoenzimático *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e o *Western blotting* (W. blot). Os três últimos são úteis para avaliação das respostas anticórpicas, mas em geral os testes baseados em resposta imune anticórpica, não distinguem entre infecção recente e passada (HARITH et al., 1987).

A IDRM é amplamente empregada na confirmação da doença ativa, no diagnóstico retrospectivo e em inquéritos epidemiológicos em áreas endêmicas (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 1997; SASSI et al., 1999). Tem grande valor presuntivo no diagnóstico da LTA, por apresentar alta sensibilidade e especificidade (> 90%) (SILVEIRA et al., 1996), mas pode apresentar reação cruzada, principalmente em indivíduos com doença de Chagas e leishmaniose visceral (SHAW et al., 1975). Resultados falso-negativos também ocorrem quando a infecção é precoce (seis semanas ou menos) ou nos casos de LCD (SILVEIRA et al., 1991). A IDRM é útil nos casos em que os parasitos são escassos nas lesões ulceradas (VEGA-LÓPEZ, 2003), e na triagem de viajantes vindos de áreas endêmicas para LTA (KAR, 1995). Entretanto, em áreas de alta endemicidade é muito frequente encontrar reatividade ao teste na população.

A RIFI e o ELISA são testes sorológicos uteis no diagnóstico nas formas clínicas com lesões extensas, múltiplas, nas lesões mucosas primárias e secundárias, (MENDONÇA et al., 1988) e em casos de co-infecção LTA/HIV (LINDOSO et al., 2009). No entanto, apresentam reações cruzadas com leishmaniose visceral e doença de Chagas (BRITO et al, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A RIFI não é eficiente no diagnóstico de LTA, devido aos baixos níveis de anticorpos circulantes (BRYCESON, 1970). No entanto, nos casos de LTA com múltiplas lesões os níveis de anticorpos detectáveis são mais elevados (MENZEL; BIENZLE, 1978; SHAW et al., 1975). Sua sensibilidade é estimada em 71 % e pode alcançar 100 % na LM, na qual a resposta imunológica do hospedeiro é intensa (MENDONÇA et al., 1988; BRITO et al., 2000).

O ELISA apresenta uma sensibilidade semelhante à da RIFI no diagnóstico da LTA, mas é mais conveniente para estudos epidemiológicos (HOMMEL et al, 1978; BRITO et al., 2000).

O W. blot apresenta sensibilidade (91%) e especificidade (100%) superiores a RIFI e ao ELISA, mas possui limitações não distinguindo infecção presente da passada e apresenta reação cruzada com outros tripanosomatídeos (BRITO et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002). O W. blot é considerado útil no controle de cura após a terapêutica e cura clínica da forma cutânea, porém os títulos, quando positivos, diminuem ou desaparecem após alguns meses (BRITO et al., 2001).

A citometria de fluxo (CF) é uma tecnologia usada na análise quantitativa de anticorpos e vem sendo utilizada no diagnóstico sorológico da LTA. Estudos mostraram a importância dessa técnica no diagnóstico de pacientes com lesão ativa e para discriminar a LTA de outras infecções por outros tripanosomatídeos (ROCHA et al., 2006). A CF foi usada em combinação com conjugados FC-ALPA-IgG e FC-AFPA-IgG para detecção de promastigotas vivos e fixados respectivamente de *L. (V.) braziliensis* e também utilizada com sucesso no monitoramento dos pacientes com LCL e da cura pós-terapêutica (PISSINATE et al, 2008; PEREIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Métodos moleculares

As limitações apresentadas pelos métodos de diagnóstico convencionais para a LTA exigem o desenvolvimento de novas abordagens, que sejam específicas e com elevada sensibilidade e reprodutibilidade. Nesse sentido têm sido realizados estudos comparando a PCR com os testes convencionais.

Diversos estudos comprovaram a alta sensibilidade, especificidade e rapidez na detecção de DNA de *Leishmania* spp. pela PCR, considerada portanto, uma técnica confiável e segura para o estudo da leishmaniose (De BRUIJN et al., 1993; REED 1996; UEZATO et al., 1998) e para estudos taxonômicos, epidemiológicos e terapêuticos (RODRIGUEZ et al., 1994).

Em uma análise comparativa da sensibilidade foi encontrado 88% para a PCR em relação à pesquisa direta (51%), cultura (47%) e o exame histopatológico (35%). A hibridização dos produtos amplificados com sondas de DNA aumenta a sensibilidade da PCR e permite identificar o gênero e o subgênero de *Leishmania* (DAVIES et al., 2000).

Uma das vantagens da PCR é a possibilidade de amplificação de DNA oriundo de fragmentos de biópsias de tecidos congelados ou frescos, amostras fixadas em formol e ou

etanol, blocos parafinados, aspirado de linfonodos, baço, medula óssea e do sangue periférico (UEZATO et al., 1998; AVILLES et al., 1999; REITHINGER et al., 2000; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010).

A persistência parasitária foi demonstrada por PCR em amostras de biópsias de 32 indivíduos com cura clínica após tratamento, revelando que a resolução clínica, nem sempre implica em eliminação do parasito ou cura (ROSSEL, et al 1992; SHUBACH te al., 1998; MENDONÇA et al., 2004).

Estudos em Centros de Referência em Leishmaniose sobre o desempenho da PCR, em paralelo aos métodos de diagnóstico convencionais em 130 amostras de pacientes com LTA revelaram sensibilidade de 92,3 % e especificidade de 93,3 % e a técnica PCR foi recomendada para os casos de diagnóstico parasitológico negativo (FAGUNDES et al., 2010).

Um estudo de validação de dois procedimentos baseados na PCR, um para o gênero de *Leishmania* e o outro para o subgênero *Viannia*, em amostras de biópsias de pacientes de área endêmica de LTA de Pernambuco mostrou uma sensibilidade de 94,3 %, para o subgênero *Viannia* e de 89,6 % para o gênero *Leishmania* e especificidade de 100 % (RODRIGUES et al., 2002).

A técnica de PCR exige cuidados inerentes ao procedimento, pois resultados falso-positivos podem resultar da contaminação de DNA oriundo de outros organismos pertencentes à família Trypanosomatidae, além de artefatos que poderão comprometer à técnica. Por outro lado, resultados falso-negativos podem advir da presença de inibidores como as nucleases que causam degradação do DNA (YANG; ROTHMAN, 2004).

Características genéticas da *Leishmania*

Os tripanossomatídeos possuem dois tipos de genomas: nuclear e mitocondrial ou cinetoplasto. O cinetoplasto constitui cerca de 10-30 % do total do DNA celular, e é chamado DNA do cinetoplasto ou kDNA (RODGERS et al., 1990).

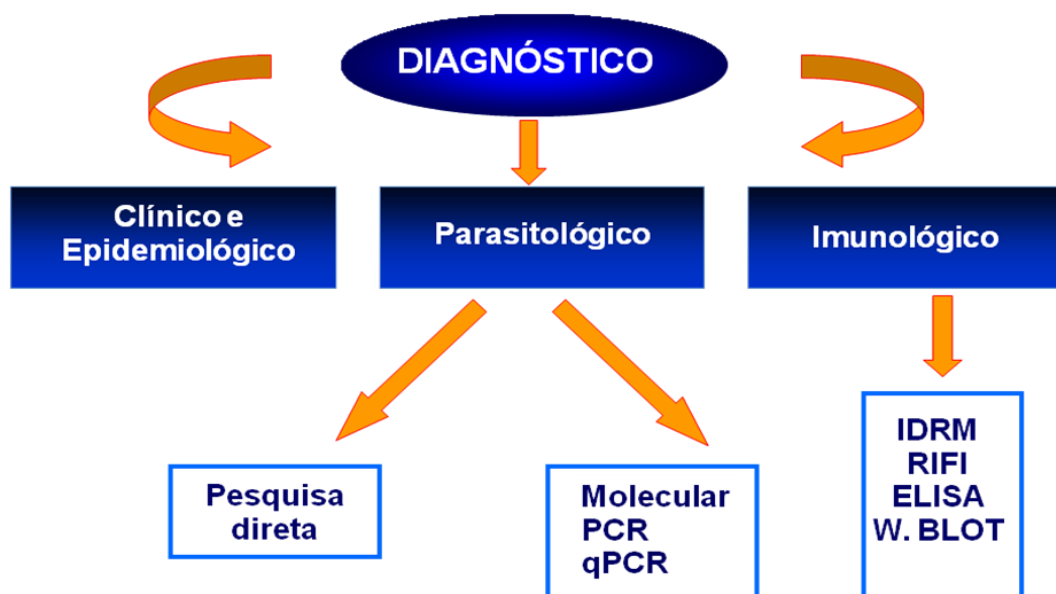
A utilização do kDNA é importante como alvo para a identificação e classificação de espécies de *Leishmania* (DASGUPTA et al., 1991; RODRIGUEZ et al., 1994; DE OLIVEIRA; BRANDÃO, 2013; RODRIGUES et al., 2013). O kDNA é constituído por um tipo peculiar de estrutura de DNA mitocondrial, próprio da família Trypanosomatidae e compreende maxicírculos com 20 a 40 kilobases (kb), presentes em 30-50 cópias e os minicírculos com

aproximadamente 850 pares de bases (pb), presentes em cerca de 10.000 cópias /célula, e representam cerca de 95 % do kDNA (RAY, 1987).

Os minicírculos são constituídos de uma região conservada de aproximadamente 200 pb, e uma região variável, que apresenta heterogeneidade entre cepas da mesma espécie (FERNANDES et al., 1999). Sequências da região variável são utilizadas em diagnóstico molecular por hibridização com sondas e por PCR (STUART, 1983; BARKER; BUTCHER, 1983; GRAMICCIA et al., 1992; RODRIGUES et al., 2002) e para taxonomia (RODRIGUEZ et al., 2000). A amplificação por PCR deste alvo, presente em múltiplas cópias, permite a detecção de *Leishmania* em amostras de material de pacientes e apresenta elevadas sensibilidade (> 95 %) e especificidade (100%) (RODRIGUES et al. 2002) servindo de alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos da LTA (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; DE BRUIJN; BARKER, 1992; DE BRUIJN et al., 1993; WILSON, 1995).

No Brasil o mkDNA é o único alvo utilizado para o diagnóstico da LTA preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL 2007; RODRIGUES et al., 2013).

Figura 6 – Esquema dos métodos de diagnóstico clínico, epidemiológico e laboratorial de LTA.



Fonte: Brito, M.E.F

Avaliação de testes de diagnósticos

Os testes diagnósticos são concebidos como um exame realizado em laboratório. É importante ressaltar que além da coleta e processamento das amostras deve-se verificar a informação clínica obtida através da história prévia, exame físico, e outros para que o conjunto dessas informações possa contribuir para um diagnóstico preciso.

Ao realizar um diagnóstico precisa-se apresentar o resultado considerando sentenças do tipo “normal-anormal”, “positivo-negativo”, “reator-não reator”; “imune-não imune”; e “compatível-não compatível”, porém deve-se considerar a precisão dessas sentenças, onde o nível de acerto deve ser mais elevado, registrando positivo quando positivo e negativo quando negativo. Neste contexto, a validação de um teste de diagnóstico é muito importante para avaliar acurácia e precisão do mesmo, por isso, vários parâmetros devem ser analisados (MISODOR, 2013).

A avaliação do desempenho de um teste diagnóstico depende intrinsecamente das hipóteses diagnósticas previamente estabelecidas, através do conhecimento antecipado da presença ou ausência da doença. Esta indicação da “verdade” é denominada de “padrão-ouro”. Algumas vezes o teste é validado a partir da descrição nosológica e *“somente depois de definir clinicamente o que se quer encontrar será possível reconhecer indivíduos portadores da condição clínica procurada”* (ROUQUAYROL, 1992). Neste contexto, uma definição diagnóstica clínica pode ser utilizada como “padrão-ouro” para comparação de resultados de testes (ROUQUAYROL, 1992).

Atualmente, grande parte da pesquisa epidemiológica tem se ocupado da validação de testes utilizando marcadores biológicos, fase que necessariamente precede a sua utilização no diagnóstico etiológico, avaliação de riscos, prevenção e controle de doenças.

A validade de um marcador se refere ao grau com que ele indica a presença do evento de interesse. Para validar a utilização de uma medida biológica, como um marcador, é necessário entender o relacionamento entre o marcador e o evento ou condição de interesse. Os marcadores biológicos podem ser validados no que se refere a eventos como doença, exposição a agentes danosos ou susceptibilidade às doenças (SCHULTE; PERERA, 1993).

Em geral, a validação de marcadores biológicos, em particular os marcadores diagnósticos de infecção, é realizada em amostragens relativamente pequenas em que os grupos em estudo são categorizados com relação ao evento de interesse. Dessa forma, as características

do marcador são determinadas, permitindo a sua utilização em estudos de grandes populações. Com o foco mais específico nas doenças infecciosas, para que um marcador diagnóstico seja considerado válido, ele deve indicar a presença do agente infeccioso e se correlacionar com outras características relevantes da doença infecciosa.

Uma das propriedades fundamentais dos testes diagnósticos são a sua validade que pode ser mensurada mediante o cálculo de sua sensibilidade, especificidade e valor preditivo (FEINSTEIN, 1977). A validade de um teste diagnóstico é medida pela sua habilidade em categorizar corretamente as pessoas realmente doentes como positivas e as sadias como negativas para o teste (HENNEKENS; BURING, 1987). Assim, a sensibilidade de um teste diagnóstico é definida pela capacidade de determinada abordagem detectar indivíduos verdadeiramente doentes, enquanto que, a especificidade, é a capacidade de o teste ser negativo, em indivíduos sadios (Figura 7). Quando o teste é sensível raramente deixa de encontrar pessoas doentes, e quando um teste é específico dificilmente dirá que pessoas sadias são doentes. Estas são características do teste e não da população em que está sendo aplicada, portanto fornecem resultados consistentes independente da prevalência da doença.

Outros indicadores são também importantes e abordam aspectos diferentes da validade de um teste diagnóstico. Estes são o valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) que expressam a probabilidade da doença estar presente ou ausente dado o resultado positivo ou negativo do teste. O VPP de um teste é a probabilidade de um indivíduo que apresente o teste positivo, seja realmente doente. O VPN é a probabilidade do indivíduo sadio quando o resultado do teste for negativo (MISODOR, 2013)

Os valores preditivos sofrem influência de acordo com a prevalência do evento/doença em estudo, se a prevalência de uma doença é baixa, mesmo com um teste muito específico, obtém muitos resultados falso-positivos, devido o elevado número de indivíduos sadios. Se a prevalência é alta pode-se esperar um maior número de resultados falso-negativos, na aplicação de testes com boa sensibilidade (MISODOR, 2013).

Nas condições de um ensaio para avaliação de um teste, dificilmente a proporção de casos entre os participantes da pesquisa coincide com a prevalência da condição/doença na população. A solução para este fato é calcular os valores preditivos corrigidos para cada prevalência possível, o que permite construir a “curva de desempenho do teste” (ROUQUAYROL, 1992).

Os ensaios para validação de testes diagnósticos são, portanto etapas importantes para consolidação de procedimentos de saúde pública, na medida em que somente a partir daí é possível aplicar técnicas diagnósticas adequadas para estudos populacionais visando o “rastreamento” de indivíduos portadores de doenças em sua fase pré-clínica e outros propósitos diagnósticos.

Figura 7 – Cálculo da propriedade da PCR para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana

Teste	Doença presente	Doença ausente
Positivo	positivos verdadeiros a	Positivos falsos b
Negativo	negativos falsos c	Negativos verdadeiros d

Total a + c b + d

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b + d}$$

$$\text{VPP} = \frac{a}{a + b}$$

$$\text{VPN} = \frac{d}{c + d}$$

Fonte: MISODOR, 2013

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, G. M., VILELA, M. L., SOUCASAUX, T. Aspectos da ecologia dos flebótomos do Parque Nacional da serra dos Órgãos do Estado do Rio de Janeiro; V - Preferências alimentares (Diptera, *Psychodidae*, *Phlebotominae*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 477-479, 1986.
- AGUILAR, C. M. et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due of *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 19-28, 1989.
- ALVES, R. et al. Biópsia cutânea: onde, quando e como? **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, Madrid, v. 39, p. 3-12, 2011.
- AVILLES et al. Detection and indentification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Equador: A comparaisom with classical diagnostic methods, **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 2, p. 181-187, 1999.
- ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 229-233, 2005.
- BADARÓ, R; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (Calazar). In: FOCACCIA, R. **Veronesi: tratado de infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. v.2, p.1559-1588.
- BARBOSA, S. et al. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in muare (*Equus caballus*) immunotherapy and quimiotherapy assays. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 217-220, 1994.
- BARRAL, A. et al. The relevance of caracterizinng *Leishmamnia* from cutaneous lesion a simples approuche for isolation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio e Janeiro, v.82, n. 4, p. 579-583, 1987
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D. Leishmaniasis in Bahia: evidence that *Leishmania amazonensis* reduces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 44, n. 5, p. 536- 546, 1991.
- BARRAL, et al. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **In Journal Dermatology**, Schaumburg, v. 34, n.7, p. 474-479, 1995.
- BARKER, D.C.; BUTCHER, J. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.77, n.3, p. 285-97, 1983.
- BEACH R., KIILU G., LEEUWENBURG J. Modification of sand fly biting behaviour by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 34, n. 2, p. 278-282, 1985.
- BELLI, A., et al. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, 58:102-109, 1988.

- BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1435-1439, 2006.
- BEENAL, KR, RAMESH V, MUKHERJEE, A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v. 30, p. 616-20, 2003.
- BERRAHAL, C.F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 55, p. 273-277, 1996.
- BITTENCOURT, A. A. et al. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 84, p. 585-586, 1989
- BOGGILD, A. K., et al. Nono-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: superior performance to conventional biopsy and histopathology. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. 1-6, 2011.
- BOGGILD, A. K., et al. Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, p. 1097-1100, 2011.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: Eco-epidemiological aspects in 'Zona da Mata' region. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 445-449, 1994.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 93, n.5, p.488-494. 1999.
- BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil, **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** Londres, v. 97, n. 3, p. 291-296, 2003.
- BRASIL. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em Saude. Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministerio da Saude, 2007. 180 p.: il. – (Serie A. Normas e Manuais Tecnicos).
- BRITO, M. E. F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical Diagnostic Laboratorial Immunology**. Washington, v.7, n.2, p.318-321. Mar. 2000.
- BRITO, M. E. F. et al., Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 95, n. 2, p. 203-206, 2001.
- BRITO, M. E. F. et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 10, n. 2445-2448, 2008.
- BRITO, M. E. F. et al. Occupationally acquired american cutaneous leishmaniasis. **Hindawi Publishing Corporation**, India, v. 2012, p. 1-4, 2012.

BRYCESON, A. D. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. II. Treatment. III. Immunological studies. IV. Pathogenesis in DCL. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 64, n. 5, p.369-374, 1970.

CONVIT, J.; KERDEL-VEGAS, F.; GORDON, B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. **Britanic Journal of Dermatology**, Londres, v.74, n. 4, p. 132-35, 1962.

COSTA, J. M. L. et al. Dissemitad cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil. A report of eigh cases. **Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 89, p. 319-323, 1986.

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

COSTA, J. M. L. et al. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v.79, (Supl 3), p.70-83, 2009.

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

COUTUNHO, S. G. et al., Pathogenes in immunopathology of leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 82 (Supp): 214-228, 1987.

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

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

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

DANTAS-TORRES , F. et al. Phetobomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phebotominae) in the state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 43 n. 6, p. 1-4, 2010.

DASGUPTA, S. et al. A cloned kinetoplast DNA minicircle fragment from *Leishmania* spp: pecific for post kala-azar dermal leishmaniasis strains. **Parasitology**, Londres, v. 102, n. 2, p.187-191, 1991.

DAVIES, C. R., LLANOS-CUENTAS, E. A, SHARP, S. J., et al. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms response to treatment, and parasite isolation rate. **Clinical Infect Diseases**, Chicago, v. 25, p. 302-310, 1997.

DAVIES, C. R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cadernos de Saude Publica**, São Pulo, v.16, n. 4, p. 925–50, 2000.

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

- DE BRUIJN, M. H.; The comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, Liverpool, v. 44, p. 201-207, 1993.
- DE OLIVEIRA, C. I. et al. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 3, p. 149-153, 2003.
- DE OLIVEIRA, RAMOS PEREIRA, L., BRANDÃO, A. An analysis of trypanosomatids kDNA minicircle by absolute dinucleotide frequency. **Parasitol International**. v. 62, n. 4, p. 397-403, 2013.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 305-318, 2004.
- ESCOBAR, M. A, et al. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge, **Tropical Doctor**, London, v. 22, p. 69–78, 1992.
- ERESH, S., M. C. C., ALLUM, S. M, BARKER, D. C. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. **Parasitology**, Amsterdam, v.109, p. 423-33,1994.
- EVANS, D. **Handbook on isolation characterization and cryopreservation of Leishmania**. Geneva: World Health Organization, 1989.
- FAGUNDES, A. et al., Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral center. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 1, p. 109-112, 2010.
- FEINSTEIN, A. R. **Clinical Biostatistics**. Saint Louis: The C. V. Mosby Company, 1977. 468 p.
- FERNANDES, O. et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, n. 3, - p. 563-568, 1999.
- FERREIRA, S. A. et al. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, n. 3-4, p. 257-263, 2008.
- FERREIRA, S. A. et al. Canine skin and conjunctival swab samples for the detection and quantification of *Leishmania infantum* DNA in an endemic urban area in Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 4, 15-96, 2012.
- FIGUEROA, R.A. et al., Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Vannia)* species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 4, p. 638-646, 2009.
- FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p.105-111, 2001.
- FORKNER, C. E, ZIA, L. S. Viable *Leishmania donovani* in nasal and oral secretion of patients with Kala-azar and the bearing of this finding on the transmission of the disease. **Journal Experimental Medicine**. New York, v. 59, n. 4, p. 491-499, 1934.

- FORATTINI, O. P. et al. Infecção natural de mamíferos silvestres em área endêmica de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 6, n. 3, p. 255-261, 1972
- FORATTINI, O. P. et al. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 181-184, 1973.
- FLOCH, H. – *Leishmania tropica guyanensis* n. sp. agent de La leishmaniose tegumentare d'es Guyanes et de l'Amérique. **Bulletin Societ Pathology**. Exot. v. 47, p. 784-785, 1954.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE - FNS. CENEPI. Série histórica de casos de agravos e doenças parasitárias: leishmaniose tegumentar. **Informe Epidemiologia**. Brasília, (SUS) v.6, n.1, 60, 121-123, v.6, n.2, 128-130, v.6, n.3, 134-136. 1997.
- GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v.101, n. 4. p. 368-371, 2007.
- GHOSH SH, et al. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. Leishmaniasis and other protozoan infections. **McGraw Hill Inc**, New York, v.7, n. 11, p. 2001 -9, 2008
- GOMES, A. H. et al. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitol**, Londres, v.119, p. 319-324, 2008.
- GONTIJO, B; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, London, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 293-307, 2012.
- GRAMICCIA, M. et al. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. **Parasitology**, Londres, v. 105, n. 1, p. 29-34, 1992.
- GRIMALDI, G., JR., TESH R. B., Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Review**, Washington DC, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993
- GUIMARÃES, V. C. F. V. et al. Phebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area cutaneous and visceral leishmaniasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n.1, p. 66-70, 2012.
- HOMMEL, M. et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 72, n. 3, p. 213-218, 1978.
- HARITH, A. E. et al. Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT

and ELISA. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 81, p. 603-606, 1987.

HENNEKENS, C. H., BURING, J. E. **Epidemiology in Medicine**. Boston /Toronto: Little, Braown and Company, 1987. p. 383,

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

KILLICK-KENDRICK R. et al. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. **Proceeding of the Royal Society**. Londres, v. 196, n. 1122, p. 105-115, 1977.

LANDIS, J.R., Koch G G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, 33:159-174, 1977.

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. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 63, n. 3, p. 408-409, 1969.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New world: taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, Londres, v. 28, n. 1, p. 44-48, 1972.

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

LAINSON, R, SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. **Nature, London**, v. 273, n. 56/54, p. 596-600, 1978.

LAINSON, R, SHAW, J. J, The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: **Biology of the Kinetoplastida**, Lumsden WHR & Evans DA (eds). London. New York and San Francisco. Academic Press, 1979, v.1, p. 1-116.

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

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

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: Lumsden WHR, Evans DA, *Biology of the Kinetoplastida*, vol. 2, Academic Press, London, p.1-116, 1979. Brazil. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 50 n. p. 158-164, 1994.

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

- LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In FEG Cox, JP Kreier, D Wakelin (eds.), Topley & Wilson's microbiology & microbiol infections, 9th ed., vol. 5, **Parasitology**, Arnold, London, p. 242-266, 1998.
- LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.
- LEITE, R. S. et al., PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 17, n. 3-4, p. 201-206, 2010.
- LEITE, R. S. The use conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia**. Vet Jaboticabal, 20, n.1, p. 36-41, 2011.
- LIMA, B. Small mammals as host of *Leishmania* spp. in a highly endemic area for zoonotic leishmaniasis in north-eastern Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical and Hygiene**, Londres, v. 1-6, 2013.
- LINDOSO, J.A. et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **Brazil Journal Dermatology**, Rio de Janeiro, v. 160, n. 2, p. 311-318. 2009
- LOMBARDO, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 184, n. 1, p.10- 17, 2012.
- MADEIRA, M. F. et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 100, n. 12, p. 442-5, 2006.
- MANOCHA, D.; BANSAL, N.; FARAH, R. S. Types and selection criteria for various skin biopsy procedures. In: KHOPKAR, U. (Ed.). **Skin Biopsy – Perspectives**. Rijeka: In Tech. 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-perspectives/types-and-selection-criteria-for-various-skin-biopsy-procedures>> Acesso em: 03 march 2013.
- MARQUES, M. J, et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. **Diagnosis Microbiology Infect Diseases**, Nova Iorque, v. 54, p.37-43, 2006.
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986.
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Três Braços, Bahia-Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 27, n. 2, p. 93-101, 1994.
- MARTINS, L. ALEXANDRINO, A., GUIMARÃES G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumenatry of the leishmaniasis patient. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 1-4, 2010.
- MARZOCHI, M. C. A. Doenças Infecto-Parasitárias. Leishmaniose no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, n.5-6, p.82-104. 1992.

MARZOCHI, M. C. A, MARZOCHI K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Caderno de Saúde Pública* Rio de Janeiro, v. 10, p. 359–375. 1994.

MENDONÇA, S. C. F. et al. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 347–55, 1988.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after cure of American cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure?. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 6, p. 1018-1023, 2004.

MENZEL, S., BIENZLE, V. Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the world. **Tropenmedizin und Parasitologie**, Stuttgart, v.29, p.194, 1978.

MIMORI, T. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. **Acta Tropica**, Basel, v. 81, n. 3, p.197-202. 2002.

MISODOR- Centro de Estudo e Treinamento online. Disponível em: [http:// www.misodor.com](http://www.misodor.com). Acesso em mar de 2013.

NAIFFI, R.D., FREITAS, R.A., ARIAS, J.R. Aspectos epidemiológicos de uma *Leishmania* de tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: Anais XI Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia; 1989. P. 24.

NAVIN, T. R.; ARANA, F.A.; DE MÉRIDA, A.M. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of the diagnostic. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, n.1, p.36-42, 1990.

OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, Holanda, v. 387, n.1-2, p. 245–253, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**: disease information. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>>. Acesso em: 27 out. 2010.

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis: disease information**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>>. Acesso em: 20 dez 2012.

PASSOS, V. M. et al. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. **Acta Tropica**, Basel, v. 72, p. 251-258, 1999.

PASSOS, V. M. A. et al., Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34 n. 1, p. 5-12, 2001.

PEREIRA, V. R. A. et al. Evaluation of anti-livered and anti-fixed *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* promastigote IgG antibodies detected by flow cytometry for diagnosis and post-therapeutic cure assessment in localized cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Philadelphia, v. 74, n.4, p. 292–298, 2012.

PIRMEZ C, et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 3, p. 1819-1823, 1999.

PISSINATE, J. F., et al. Upgrading the flow-cytometry analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Journal Immunology Methods, Seattle**, v.336, p.193–202, 2008.

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, Nova Iorque, v. 17, n. 3, p. 177-190, 1987.

REED S. G. – Diagnosis of Leishmaniasis. **Journal of Clinics in Dermatology**, Washington, v. 14, n. 5, p. 471-478, 1996.

REINTHNER, R. et al., Use of PCR to detect *Leishmania (Viannia)* spp. In dog blood and bone marrow. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 38, n. 2, p.748-751, 2000.

REIS, L. C. et al. Clinical, epidemiological and laboratorial aspectos of patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 439-43. 2008.

ROCHA, R. D. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical and Medicine International Health**, Oxford, v. 11, n p. 156–66, 2006.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, New York, v.71, p.267-275. 1990.

RODRIGUES, E. H. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.40, n.10, p.3572-3576. 2002.

RODRIGUES, E. H., et al. The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Vectors**. London, 2013.

RODRIGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n. 9, p. 2246-2252, 1994.

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

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, I. et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. **Experimental Parasitology**, New York, v. 112, n. 1, p. 44-51, 2006.

ROMERO G.A. S. Sensivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio e Janeiro, v.94, p. 505-508,1999.

- ROSSEL, R. A , et al.: Is leishmaniasis ever cured? **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 86 n. 3, p. 251-253, 1992.
- ROUQUAYROL, M. Z., ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia & Saúde**. 5. ed. Rio de Janeiro. Mdesi, 1992, 600p.
- SAMPAIO, S. A. P., RIVITTI E. A. **Erupções vésico-bolhosas**. In: Sampaio SAP, Rivitti EA, editors. **Dermatologia**. São Paulo: Artes Médicas; p. 229-248,1998.
- SAMPAIO, R. N. R., et al. Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 5, p. 557-561, 2002
- SALINAS, G., et al. Detection de amastigotas en leishmaniasis cutanea y mucocutanea por el metodo de imunoóxidase, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas com métodos convencionales de diagnostico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 53-60, 1989
- SARAIWA, N.G.; VALDERRAMA, L.; LABRADA, M. et al. - The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 159, n. 4, p. 725-735, 1989.
- SASSI A. et al. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clinical Experimental Immunology, London**, v. 116, p. 127-132, 1999.
- SAVANI, E. S. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 229-33, 2004.
- SOKAL, J.E. Measurement of delayed skin-test responses. *New Engl Journ Med*. 293:501-502, 1975.
- SCHUBACH, A. et al., : Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 178, n. 3, p. 911-914, 1998.
- SCHUBACH, A. et al. Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 58, p. 824-827, 1998.
- SCHULTE, P. H., PERERA, F. P. **Molecular Epidemiology**: principles and practice. London : Academic Press, 1993. 244p.
- SHAW, J. J. et al. Some observations on intradermal reaction different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 69, n. p. 323-335, 1975
- SHAW, J. J. et al. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Leishmania) shawi* in Pará state. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 66, n. 6, p.243-246, 1991.

- SILVEIRA, F. T., et al. Dermal leishmaniasis in the Amazon region of Brazil: *Leishmania (Viannia) lainsoni* sp .n., a new parasite from the state of Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 289-292, 1987.
- SILVEIRA, F.T., et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. **Revista Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 33, n. 1, p. 18-22, 1991.
- SILVEIRA, T. G. V., TEODORO, U., ARRAES, S. M. A. A, et al. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Parana State, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**; Rio de Janeiro, v. 8, p. 475–476, 1990.
- SILVEIRA, F.T. et al., Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 85, n. 6, p. 735-8, 1991.
- SILVEIRA, T. G. et al., Epidemiology aspects of cutaneous in an endemic area of the State of Paraná, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. São Paulo, v. 12, n.2, p. 141-147, 1996.
- SILVEIRA, F.T., et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindembergi* n. sp. A new leishmanial parasite os man in the Amazon region. **Parasitology**, Londres, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2002.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). **Leishmaniose tegumentar americana**: Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 09/2012.
- STRAUSS-AYALI, D. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 189, n. 9, p. 1729-1733, 2004.
- STUART K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 9, n. 2, p. 93-104, 1983.
- TOLEZANO, J. E. et al. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (Canis familiaris) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149. n. 3-4, p. 280-284, 2007.
- TURETZ, MACAHADO, KO, A. L. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging from of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **Journal Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, 2006.
- UEZATO et al. Comparative studies of the detection rates of *Leishmania* parasites from formalin, ethanol - fixed, frozen human skin specimens by polymerase chain reaction and Southern blotting. **Journal of the Dermatology**, Schaumburg, v. 25, n. 5, p. 1998.
- VALENCIA, A. M. et al., Non-invasive cytology brush PCR diagnostic and causative species identification of American cutaneous leishmaniasis in Peru. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, p. 1-6, 2012.

VASCONCELOS, I. A. B. et al. The identity of *Leishmania* isolated from sand flies and vertebrate hosts in a major focus of cutaneous leishmaniasis in Baturite, Northeast Brazil. **American Journal and Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, n. 2, p.158-164, 1994.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Londres, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VIANNA, G. – Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (nota preliminary) *Brasil Medicina*, v. 25 p. 411, 1911.

WEIGLE, K. A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 36, n. 3, p. 489-496, 1987.

WEIGLE, K. A.; SARAIVA N.G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinical Dermatology**, Rome, v. 14, n. p. 433-450, 1996.

WILSON, S.M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, Liverpool, v. 89, Suppl 1, p.95-100. 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/index.html>> e <http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index.html>. Acesso em: 30 set 2012.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **Lancet**, Londres, v. 4, n.6, p. 337-348, 2004.

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

CAPÍTULO II

ARTIGO 1

Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: uma avaliação crítica dos estudos realizados no Estado de Pernambuco

Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. Maria Edileuza Felinto de Brito, Maria Sandra de Andrade, Filipe Dantas-Torres, Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, Milena de Paiva Cavalcanti, Alzira Maria Paiva de Almeida, Sinval Pinto Brandão-Filho. Rev Soc Bras Med Trop. 2012 Jul-Aug;45(4):425-9. Epub 2012 Jul 26

Esse artigo é uma revisão narrativa da epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. Apresenta um levantamento sobre o ciclo de transmissão da LTA envolvendo os diversos agentes etiológicos, numerosas espécies de vetores, reservatórios - hospedeiros, população humana e o diagnóstico da doença no período de 1940 a 2012.

Foi realizado um levantamento epidemiológico em bases eletrônicas: Medline, PubMed, Lilacs, BVS e Scielo sobre a LTA em Pernambuco. Esses artigos comprovam a complexidade do ciclo de transmissão da LTA nas regiões de estudo.

A literatura mostra que a *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie na região com diferentes zimodemas. Achados recentes incluem a *L. (V.) shawi* como uma das espécies de interesse epidemiológico.

Diferentes espécies de flebotomíneos ocorrem em diversos ecótopos no Estado, predominando a *Lutzomyia whitmani* no intra e peridomicílio, enquanto que *L. complexa*, *L. choti* e *L. sordelli* predominam em áreas de resquícios de Mata Atlântica.

A *L. (V.) braziliensis* foi identificada em roedores silvestres e sinantrópicos, nas espécies *Nectomys squamipes*, *Bolomys lasiurus* e *Rattus rattus*, os quais foram apontados como hospedeiros do parasito.

Para o diagnóstico têm sido empregados testes imunológicos tradicionais: intradermoreação de Montenegro (IDRM) reação de imunofluorescência indireta (RIFI), *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e o *Western blotting* (W. blot). Em Pernambuco, foi validada a técnica de reação

em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico molecular de LTA, utilizando *primers* específicos para minicírculos do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* subgênero *Viannia*.

Essa revisão fornece ampla visão sobre os conhecimentos acerca da LTA em Pernambuco e contribui para direcionar novos estudos, além de introduzir estratégias de controle da doença.



Review Article/Artigo de Revisão

Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco

Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: uma avaliação crítica dos estudos realizados no Estado de Pernambuco

Maria Edileuza Felinto de Brito^{1,2}, Maria Sandra Andrade³, Filipe Dantas-Torres¹, Eduardo Henrique Gomes Rodrigues¹, Milena de Paiva Cavalcanti¹, Alzira Maria Paiva de Almeida¹ and Sinval Pinto Brandão-Filho¹

ABSTRACT

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a complex disease with clinical and epidemiological features that may vary from region to region. In fact, at least seven different *Leishmania* species, including *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi*, *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi*, and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, have been implicated in the etiology of ACL in Brazil, and numerous phlebotomine sandfly species of the genus *Lutzomyia* have been regarded as putative or proven vectors. Because ACL is a focal disease, understanding the disease dynamics at the local level is essential for the implementation of more effective control measures. The present paper is a narrative review about the ACL epidemiology in Pernambuco, northeastern Brazil. Furthermore, the need for more effective diagnosis, treatment, control and prevention strategies for the affected populations is highlighted. This paper will provide researchers with a critical appraisal of ACL in Pernambuco. Hopefully, it will also be helpful for public health authorities to improve current control strategies against ACL at the state and country levels.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Reservoirs. Insect vectors. Diagnosis. Epidemiology.

RESUMO

A leishmaniose cutânea americana (LCA) é uma doença complexa com características clínicas e epidemiológicas que podem variar de região para região. De fato, pelo menos, sete diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi*, *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, têm sido incriminadas na etiologia da LCA no Brasil, e numerosas espécies de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*, foram considerados vetores suspeitos ou comprovados. Devido ao seu caráter focal, a compreensão da dinâmica da LCA a nível local é imprescindível para a implementação de medidas de controle eficazes. Este trabalho consiste de uma revisão narrativa sobre a epidemiologia da LCA em Pernambuco, nordeste do Brasil. Além disso, se enfatiza a necessidade de maior efetividade no diagnóstico, tratamento, controle e estratégias de prevenção para as populações afetadas. Este artigo fornecerá aos pesquisadores uma avaliação crítica da LCA em Pernambuco. Espera-se também contribuir com as autoridades de saúde pública no aprimoramento das estratégias atuais de controle da LCA nos níveis estaduais e nacional.

Palavras-chaves: Leishmaniose cutânea. *Leishmania braziliensis*. Reservatórios. Insetos vetores. Diagnóstico. Epidemiologia.

INTRODUCTION

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a complex disease with clinical and epidemiological features that may vary from region to region¹. Because ACL is a focal disease, understanding the disease dynamics at the local level is essential for the implementation of more effective control measures.

In Brazil, ACL presents variable epidemiological patterns, which may vary according to the phlebotomine sandfly species involved in transmission, population susceptibility and the level of exposure as well as the diversity and competence of reservoir hosts.

A number of studies on ACL in Pernambuco State, northeastern Brazil, have been performed in the past decades and have contributed enormously to the knowledge of ACL ecoepidemiology at the state and country levels²⁻⁷. In particular, the importance of small terrestrial mammals in the transmission chain of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*⁷, the most widespread etiological agent of ACL in Brazil, has been demonstrated.

This paper is a narrative review regarding the ACL epidemiology in Pernambuco. Articles were searched in electronic databases (i.e., Medline, Lilacs and SciELO) using the following search terms: leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, tegumentary leishmaniasis, *Leishmania*, *Lutzomyia*, and Pernambuco. Search terms were used alone or in combination and with no language or release date restriction (as of January 2012). Studies investigating the epidemiology, diagnosis, etiology, reservoirs and vectors of ACL were included whereas those exclusively focusing on visceral leishmaniasis were excluded. Additionally, references of retrieved articles were searched for relevant papers that could not have been located in the searched databases. The importance of control and prevention strategies for the affected populations and the need for effective diagnostic tools and treatment procedures are discussed. This paper will provide researchers with a critical appraisal of ACL in Pernambuco. Hopefully, it will also be helpful for public health authorities to improve current control strategies against ACL at the state and country levels.

1. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE. 2. Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 3. Departamento de Enfermagem, Universidade de Pernambuco, Recife, PE.

Address to: Dra. Maria Edileuza Felinto de Brito. Depto. Imunologia/CPqAM/FIOCRUZ-PE. Campus da UFPE, s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Phone/Fax: 55 81 2101-2641; 55 81 2101-2640

e-mail: britomef@cpqam.fiocruz.br

Received in 15/03/2012

Accepted in 20/06/2012

DIVERSITY OF ETIOLOGICAL AGENTS

Seven species of *Leishmania* have been implicated as ACL agents in Brazil: *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi*, *Leishmania* (*Viannia*) *shawii*, *Leishmania* (*Viannia*) *lindenbergi*, and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*⁸. However, *L. (V.) braziliensis* is the main ACL etiological agent in Pernambuco and other Brazilian states^{1,4,9-11}.

In a study conducted in Amaraji and Cortes (two municipalities from the southern Atlantic Forest region) (Figure 1) in 1991, two strains isolated from humans and characterized with multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) exhibited an enzymatic profile similar to *L. (V.) braziliensis stricto sensu*, except for the enzymes isocitrate dehydrogenase-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (IDH-NADP) and phosphoglucomutase (PMG), which were different from the reference strain MHOM/BR/75/M2903. These strains were grouped as a new zymodeme IOC-Z45, a variant of the species¹².

Between 1996 and 2000, in a longitudinal study conducted in Raiz de Dentro, Refrigério and Tranquilidade from Amaraji, 30 strains were isolated from patients presenting predominantly single ulcerated lesions. These strains were placed into serodeme 1 with monoclonal antibodies. Through MLEE, they were all identified as *L. (V.) braziliensis*, although some of them showed different electrophoretic mobility profiles (electromorphs) for the PGM, IDH-NADP and malic enzyme (ME) and were grouped into four new zymodemes: IOC-Z72, IOC-Z73, IOC-Z74, and IOC-Z75¹⁰.

Another study in three different areas in Pernambuco (Amaraji (southern Atlantic Forest), Paudalho (northern Atlantic Forest region), and Moreno (metropolitan region of Recife) (Figure 1) was performed in 2009. Sixty-seven samples isolated from patients with different ACL clinical forms were identified as *L. (V.) braziliensis* serodeme 1 with monoclonal antibodies. Through MLEE, 10 different zymodemes (IOC-Z26, IOC-Z27, IOC-Z45,

IOC-Z72, IOC-Z73, IOC-Z74, IOC-Z75, IOC-Z78, IOC-Z105, and IOC-Z106) were found (Figure 1). Most of these zymodemes were classified^{9,10}. It should be noted that this was the first report of *L. (V.) shawii* in Pernambuco.

In a study performed in 2008 in Mundo Novo, a rural community in São Vicente Férrer, a municipality of the Agreste region (scrub region) (Figure 1) where visceral leishmaniasis has sporadically been diagnosed in dogs and humans, 20 dogs were found to be positive for *L. (V.) braziliensis* with polymerase chain reaction (PCR). This finding revealed a high exposure level to *Leishmania* spp. in dogs in this area¹¹ and suggested that dogs might eventually be infected with *L. (V.) braziliensis*.

These findings strongly indicate that the transmission cycle complexity and the co-existence of two or more species circulating in the same area may be reflected in the genetic polymorphism of this *Leishmania* population. A recent study suggested that the parasite's genetic diversity may be associated with particular transmission cycles, most likely reflecting the adaptation of different parasite clones to distinct vector species¹².

OCCURRENCE AND DISTRIBUTION OF VECTORS

During the 1940s, studies on phlebotomine sandflies in northeastern Brazil reported the occurrence of *Lutzomyia fischeri*, *Lutzomyia evandroi*, *Lutzomyia squamiventris*, and *Lutzomyia migonei* in the Atlantic Forest region of Pernambuco¹³. Since then, approximately 37 sandfly species have been identified in this state¹⁴.

From 1979-1980, a study was performed in Igarassu (northern Atlantic Forest region), and *Lutzomyia whitmani* was the most abundant species¹⁵. In another study conducted in Amaraji, one of the major ACL foci in Pernambuco, eight species were identified, but again, *L. whitmani* was predominant in domestic and peridomestic areas. Furthermore, this sandfly was found to be naturally infected by *L. (V.) braziliensis*^{4,16}. Other studies have confirmed that *L. whitmani*

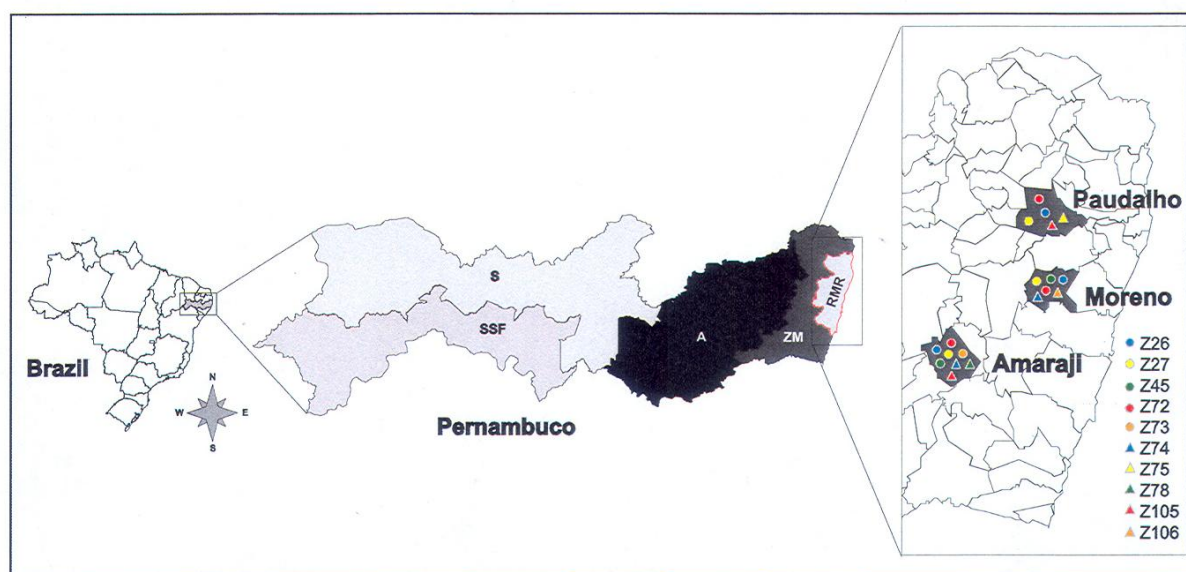


FIGURE 1 - Diversity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* zymodemes in three municipalities (Amaraji, Moreno and Paudalho) of Pernambuco. The geographic regions mentioned (metropolitan region of Recife, Atlantic Forest region, scrub zone and semi-arid region) in the text are also depicted.

RMR: Região Metropolitana de Recife; ZM: Zona da Mata; A: Agreste; S: Sertão; SSF: Sertão do São Francisco.

is adapted to the domestic environment and can also be found indoors in Amaraji¹⁶. Moreover, this species is highly anthrophilic¹⁷, which partly explains the high prevalence of ACL in this area. A more recent investigation in the municipality of Moreno also revealed the predominance of *L. whitmani*⁶. Undoubtedly, *L. whitmani* is the most important vector of *L. (V.) braziliensis* in Pernambuco.

A recent survey performed in São Vicente Férrer demonstrated that in contrast with Igarassu and Amaraji, *L. migonei* was the predominant species in domestic and peridomestic environments, whereas *Lutzomyia complexa* and *Lutzomyia sordelli* were predominant in forest remnants¹⁸. Similarly, a study conducted in a military training area in Paudalho reported a high diversity of phlebotomine sandflies, with the predominance of *Lutzomyia complexa* and *Lutzomyia choti*^{3,5}. In contrast, in a large study in an Atlantic Forest reserve located in Recife, the most abundant species was *Lutzomyia umbratilis*¹⁹. This sandfly is a vector of *L. (V.) guyanensis*, whose presence in Pernambuco is uncertain.

The phlebotomine sandfly fauna of Pernambuco is rich. However, *L. whitmani* is predominant in most of the ACL transmission foci, mainly in domestic and peridomestic areas, whereas *L. complexa* or other species prevail in wild environments⁵. Compared with other northeastern Brazilian states, the phlebotomine sandfly fauna of Pernambuco is more diverse than Alagoas, Ceará, Paraíba, Piauí, Rio Grande do Norte, and Sergipe but not Maranhão and Bahia¹³. The high abundance and widespread distribution of phlebotomine sandfly vectors in Pernambuco indicate that most of the population is exposed to *Leishmania* spp. infection.

WILD AND SYNANTHROPIC RESERVOIR HOSTS

Leishmania (V.) braziliensis has been detected in several wild and synanthropic rodents of the genera *Akodon*²⁰, *Proechimys*²¹, *Rattus*^{2,22}, *Oryzomys*^{2,23,24}, *Rhipidomys*²⁵, *Nectomys* and *Necromys*² and marsupials of the genus *Didelphis*^{2,21}. In most cases, the isolates from these animals have neither been properly identified nor characterized; the identification was typically based on morphological characteristics and the behavior of the parasites in culture only.

A pioneering study targeting small mammals as probable *Leishmania (V.) braziliensis* reservoirs in Pernambuco was conducted in Amaraji, and a total of 407 rodents and 71 marsupials were trapped and analyzed. Remarkably, amastigotes in liver and spleen imprints consistent with *Leishmania* spp. were found in specimens of *Nectomys squamipes* (n=5), *Necromys* (syn. *Bolomys*) *lasiurus* (n=5), and *Rattus rattus*². Another study in the same area presented evidence of *Leishmania* infection in several rodent species. Five *L. (V.) braziliensis* isolates from *N. lasiurus* and one from *R. rattus* were identified and characterized, and different zymodemes were identified⁷. It is noteworthy that the zymodeme IOC-Z74 was isolated from human patient samples, sentinel hamsters, vectors and both wild and synanthropic rodents, suggesting that this is the predominant zymodeme in the region^{7,10}. Considering the difficulties related to the cultivation, isolation and maintenance of *L. (V.) braziliensis* parasites, these results represented an important achievement²⁶. Similarly, a study in São Vicente Férrer also provided evidence of *Leishmania* infection in *N. squamipes*, *R. rattus*, and *Holochilus sciureus*²⁷ with PCR.

Usually, these animals display no visible lesions consistent with ACL despite being parasitized, suggesting that the *Leishmania* parasites in their primitive form have adapted to these hosts²².

Therefore, these animals have the potential to act as long-term maintainers of *L. (V.) braziliensis* in nature⁷. The identification of *N. squamipes*, *N. lasiurus* and *R. rattus* hosting *L. (V.) braziliensis* represents a major contribution to the knowledge of the epidemiology of ACL in Brazil and allows for a better understanding of the role of these species as reservoirs of this important parasite⁷.

Although serological and/or molecular evidence of *Leishmania (V.) braziliensis* in domestic dogs from ACL endemic areas have been reported^{2,11}, further research is necessary to ascertain the role of these animals in the ACL transmission chain in Pernambuco.

AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN HUMAN POPULATIONS

From a historical perspective, the first ACL cases recorded in Pernambuco date back to the 1930s, when the disease was detected in rural workers from the Atlantic Forest region^{28,29}.

From 1989 to 1991, 1,604 cases were reported to the Ministério da Saúde (MS), most (64.2%) of which were detected in the Atlantic Forest region³, particularly in the municipalities of Amaraji and Cortês. In the beginning of the 1990s, an active search for ACL cases in this area identified 127 human cases³. Subsequent studies showed a 10-fold increase in ACL over a 10-year period in the region¹. From an epidemiological standpoint, the infection was more prevalent in adult males (but was also recorded in females) and children, eventually affecting all of the members of the same family⁴.

In 1996, an outbreak of ACL occurred in a military training camp (*Campo de Instrução Marechal Newton Cavalcanti* - CIMNC, Paudalho) in a region of somewhat preserved Atlantic Forest, affecting 26 trainee soldiers. An epidemiological investigation in this area detected a 24.1% infection prevalence in that population³. From 1996 to 2010, 197 ACL cases were diagnosed among trainee soldiers from CIMNC; an average of 16 cases per year. Therefore, it was concluded that a primary enzootic cycle was established in this area (with a somewhat defined fluctuation of cases, with sporadic outbreaks followed by low-occurrence periods^{5,30}).

In 2010, 25 ACL cases were registered in an outbreak in Igarassu, and an active search detected 49 additional cases in the region³¹. The diagnosis was mostly based on the presence of skin lesions in conjunction with the microscopic detection of amastigotes in skin samples and/or a positive Montenegro skin test. Most patients presented with typical localized lesions. Different age classes (>10 years) and both sexes were affected, although most of the patients were males³¹.

Using the Montenegro skin test, a study conducted in Moreno reported a 30% positivity in a population of 481 individuals. The positivity was higher among males and among individuals aged 11 to 30 years. Interestingly, 67% of the positive individuals had no previous ACL history⁶.

From 2001 to 2010, 4,855 ACL cases were recorded in Pernambuco, with an average of 485 cases per year³². In fact, ACL is endemic in all of the geographical regions of Pernambuco, and outbreaks are sporadically detected in the Agreste and Atlantic Forest regions⁴. Although the highest prevalence of ACL is still recorded in the Atlantic Forest region⁷, the disease is spreading to other areas, and the incidence is increasing in the entire state. Importantly, most of the affected people live in poor villages in rural areas and are permanently exposed to the disease risk factors, typically for occupational reasons, as observed in other Brazilian regions³³.

AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS DIAGNOSIS

The routine diagnosis of ACL in Pernambuco, particularly in rural areas, is based on clinical and epidemiological criteria. In Recife, the state's capital, both traditional (e.g., cytology) and modern techniques (e.g., PCR) are available in reference hospitals and research centers.

A study performed in 2000 on the antibody response of patients from an endemic ACL area with immunoblotting using antigenic *L. (V.) braziliensis* fractions identified the 27 and/or 30 kDa soluble antigens, which were considered promising for ACL diagnosis³⁴. Immunoblotting was more sensitive (91%) and specific (100%) than the indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In 2001, the same antigenic fractions were employed to analyze the antibody response level in patients before and after treatment³⁵. Because the levels of these antigens were decreased approximately twofold in clinically recovered patients, it was concluded that they may be used as markers of healing or parasite persistence in human patients.

The introduction of molecular biology techniques has greatly improved the diagnosis of ACL in Pernambuco and elsewhere in Brazil. Two specific systems for the subgenera *Viannia* and *Leishmania* have been assessed, revealing 95.5% and 88.2% sensitivity, respectively, and 100% specificity for healthy individual samples³⁶. Indeed, PCR-based methods are significantly more sensitive than the conventional tests, such as direct examination, histopathological examination and skin sample culture.

Polymerase chain reaction, culture and histopathological examination were also compared in 32 samples from clinically cured ACL patients after chemotherapy. *Leishmania (Viannia)* sp. Deoxyribonucleic acid (DNA) was detected in 93.7% of the patients, and three strains were identified through culture. In the histopathological examination, no parasite was found. However, fibroblastic changes were present in all of the cases, with an inflammatory focus observed in four cases, suggesting the persistence of parasites in these patients after chemotherapy³⁷. This result was confirmed by the parasite isolation from (n=3) individuals' scars 5 years after clinical cure³⁷.

In a study involving 19 patients with lesions compatible with ACL from different localities of Pernambuco, 89% of them were positive with the Montenegro skin test, 79% with IFAT, 58% with skin cytology and 75% with PCR³⁸. These results clearly illustrate the importance of combining different diagnostic techniques to improve the detection level.

FINAL COMMENTS AND CONCLUSIONS

Many ecoepidemiological aspects of ACL in Pernambuco have been characterized in recent years as an important contribution to the understanding of the infection prevalence and disease expression. Moreover, the characterization of vectors and reservoir hosts involved in the transmission and maintenance of *L. (V.) braziliensis* in this region has also been assessed.

Leishmania (V.) braziliensis is the main etiological agent of ACL in Pernambuco, where 10 or more variants circulate. Phlebotomine sandfly vectors are widely distributed over the state's territory, with the predominance of *L. whitmani* in domestic and peridomestic areas and *L. complexa* in forest remnants in most ACL foci. Concerning

L. (V.) braziliensis reservoirs, *N. squamipes*, *N. lasiurus* and *R. rattus* have been suggested as possible parasite maintainers in natural transmission cycles, but further transmission studies are needed to better understand their role. For instance, *R. rattus*, originally from Europe, established as synanthropic animals throughout Brazil and now it can be found both in human dwellings and in the fields. On the other hand, from an evolutionary viewpoint, its relationship with *L. (V.) braziliensis* is recent and it is unknown to what extent this imported rodent has adapted to this native parasite and vice versa.

The Atlantic Forest region is responsible for more than 60% of all of the ACL cases reported in Pernambuco, which emphasizes the need to establish and strengthen preventive and control measures against the disease in this region. Nonetheless, it is also important to promote continuous education for physicians and the capacity of public health professionals working in newly detected ACL foci to speed diagnostic and treatment procedures in these areas.

The diversity of *Leishmania* species or variants found in vertebrate hosts and vectors reflects the complexity of ACL in Pernambuco, which makes the design and implementation of control programs for this endemic disease a challenge for public health authorities. It is expected that this paper will provide public health authorities with essential information on ACL in this Brazilian state, which may be helpful for designing more effective control programs. Current control strategies have not been sufficient to stop or even reduce the disease burden.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks to José Ferreira Marinho-Junior for his technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. J Bras Med 1992; 63:82-104.
2. Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito MEF, Almeida FA, Nascimento LA. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco Brazil: Eco-epidemiological aspects in "Zona da Mata" Region. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89:445-449.
3. Brandão-Filho SP, Brito MEF, Martins CA, Sommer IB, Valença HF, Almeida FA, et al. Leishmaniose tegumentar americana em centro de treinamento militar localizado na Zona da Mata de Pernambuco, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1998; 31:575-578.
4. Brandão-Filho SP, Campbell-Lendrum DH, Brito MEF, Shaw JJ, Davies CR. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1999; 93:488-494.
5. Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, Lima BS, Almeida EL, Albuquerque EL, et al. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in military training area Zona da Mata in Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38:229-233.
6. Brito MEF, Silva CJ, Silva CM, Salazar PR, Coutinho JS, Reis LC, et al. Clinical epidemiological profile of American tegumentary leishmaniasis at the Pinto Sugar Mill in Moreno Municipality, Greater Metropolitan Recife, Pernambuco State, Brazil. Cad Saude Publica 2008; 10:2445-2448.
7. Brandão-Filho SP, Brito MEF, Carvalho FG, Ishikawa E, Cupolilo E, Floeter Winter LM, et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2003; 97:291-296.

8. Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology. London: Academic Press; 1987. p. 1-120.
9. Brito MEF, Brandão-Filho SP, Salles NR, Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1993; 88:633-634.
10. Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, et al. Species diversity of *Leishmania (Viannia)* parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Trop Med Int Health 2009; 14:1278-1286.
11. Dantas-Torres F, Cavalcanti MP, Figueredo LA, Melo MSFJ, Almeida EL, Brandão-Filho SP. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. Vet Parasitol 2010; 170:313-317.
12. Cupolillo E, Ibrahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol 2003; 41:3126-3132.
13. Lucena DT. Flebotômicos do Nordeste - contribuição para o conhecimento de sua distribuição geográfica. Bolm Secr Agric Ind Com Est Pernambuco 1950; 17:184-191.
14. Dantas-Torres F, Andrade AJ, Tenório KER, Andrade JD, Balbino VQ, Brandão-Filho SP. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in the state of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 2010; 43:733-736.
15. Lucena DT, Oliveira MHCC, Leal MCA. Variação mensal dos flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) de Igarassu, PE. Cad Ômega Univ Fed Rural PE. Ser Biol 1984; 1:19-27.
16. Campbell-Lendrum DH, Brandão-Filho SP, Pinto MC, Vexenat PD, Davies CR. Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. Bull Entomol Res 2000; 90:41-48.
17. Campbell-Lendrum DH, Pinto MC, Brandão-Filho SP, Souza AA, Ready PD, Davies CR. Experimental comparison of anthropophily between geographically dispersed populations of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae). Med Vet Entomol 1999; 13:299-309.
18. Guimarães VCFV, Costa PL, Silva FJ, Silva KT, Silva KG, Araújo AIF, et al. Phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in São Vicente Férrer, a sympatric area to cutaneous and visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2012; 45:60-70.
19. Balbino VQ, Andrade MS, Coutinho-Abreu I, Sonoda IV, Marcondes CB, Shaw JJ, et al. Sandflies (Diptera: Psychodidae) species in Pernambuco State, northeastern Brazil, incriminated as vectors of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. Zootaxa 2005; 1078:25-32.
20. Forattini OP, Patolli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Infecção natural de flebotomíneos em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica 1972; 6:431-433.
21. Lainson R, Shaw JJ. Leishmanias and leishmaniasis of the New World, with particular reference to Brazil. Bull Pan Am Health Organ 1973; 7:1-19.
22. Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Fe Filho NM, Queiroz RG, Santana EW, Bozza M, et al. 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 1994; 50:158-164.
23. Lainson R, Shaw JJ. 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 1969; 63:408-409.
24. Forattini OP, Patolli DBG, Rabello EX, Ferreira OA. Nota sobre infecção natural de *Oryzomys capito laticeps* em foco enzoótico de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica 1973; 7:181-184.
25. Lainson R, Shaw JJ, 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 1981; 75:530-536.
26. Weigle KA, Dávalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia NG, D'lessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. Am J Trop Med Hyg 1987; 36:489-496.
27. Lima BS. Perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana em São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, Brasil. [Masters Dissertation]. [Recife]: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fundação do Instituto Oswaldo Cruz; 2007. 75 p.
28. Coutinho B, Lobo J. Aspectos clínicos das linfopatias leishmanióticas. Anais Faculdade Med Recife 1935; 3:41-53.
29. Barreto JB. A Saúde Pública no Brasil. Bol Oficina Sanit Panam 1939; 18:923-940.
30. Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, Ishikawa E, Carvalho SMS, Brandão-Filho SP. New American tegumentary leishmaniasis outbreak in a military training center in Zona da Mata region northern State of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42:1-3.
31. Ramos JVA, Santana JA, Reis S, Santana IM, Gonçalves SC, Paiva-Cavalcanti M, et al. Avaliação clínica-epidemiológica e terapêutica dos casos de leishmaniose tegumentar ocorridos no distrito de Três Ladeiras - Igarassu - PE. X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPX. 2010. [Cited 2012 June 5]. Available from: <http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R1961-2.PDF/>.
32. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana: Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2010. [Cited 2012 June 5]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/hta_casos08_09_11.pdf.
33. Shaw JJ. The leishmaniasis - survival and expansion in a changing world. A mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102:541-547.
34. Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. Clin Diag Laborat Immunol 2000; 7:318-321.
35. Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001; 95:203-206.
36. Rodrigues EHG, Brito MEF, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. J Clin Microbiol 2002; 40:3572-3576.
37. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? J Infect Dis 2004; 189:1018-1023.
38. Reis LC, Brito MEF, Almeida EL, Felix SM, Medeiros ACR, Silva CJ, et al. Clinical, epidemiological and laboratorial aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41:439-443.

CAPÍTULO III

ARTIGO 2

Publicado na Revista Case Reports in Dermatological Medicine

Leishmaniose tegumentar americana adquirida ocupacionalmente

Occupationally Acquired American Cutaneous Leishmaniasis. Case Report. Maria Edileuza Felinto de Brito, Maria Sandra Andrade, Éricka Lima de Almeida, Ângela Cristina Rapela Medeiros, Roberto Pereira Werkhäuser, Ana Isabele Freitas de Araújo, Sinval Pinto Brandão-Filho, Alzira Maria Paiva de Almeida, and Eduardo Henrique Gomes Rodrigues. Case Reports in Dermatological Medicine, Volume 2012 (2012), Article ID 279517, 4 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/279517>.

Nesse artigo são relatados dois casos de acidentes ocupacionais de leishmaniose tegumentar americana (LTA): um adquirido por auto inoculação no ambulatório de dermatologia com amostra obtida de punção de lesão de paciente com LTA e o outro adquirido durante a coleta de aves durante estudos ecológicos em área endêmica da doença.

O diagnóstico nos dois pacientes foi confirmado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para minicírculos do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* subgênero *Viannia* a partir de amostras coletadas por método não invasivo (*swab*).

Do paciente contaminado durante trabalho em campo em localidades do Pará foi obtido um isolado por cultura *in vitro*, o qual foi identificado e caracterizado por anticorpos monoclonais específicos e eletroforese de enzimas multilocus, como *Leishmania* (*V.*) *naiffi*, espécie até então não identificada em Pernambuco.

Essa publicação mostra a viabilidade da coleta de amostras de exsudatos de lesões por *swab* para diagnóstico da LTA pela PCR e enfatiza a importância de proteção individual durante o desenvolvimento de trabalho em laboratório e no campo.

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

Case Report

Occupationally Acquired American Cutaneous Leishmaniasis

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

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

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

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

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

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

Received 2 October 2012; Accepted 6 November 2012

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

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

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

1. Introduction

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

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

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

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



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

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

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

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

2. Case Reports

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

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

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

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

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

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

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

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

3. Discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

Acknowledgment

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

References

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

CAPÍTULO IV

ARTIGO 3**Submetido a revista *Experimental Parasitology*****Coleta de amostras por *swab*, um procedimento não-invasivo para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana**

Sample collection by cotton swab, a safe non-invasive procedure for American cutaneous leishmaniasis diagnosis. Ana Isabele Freitas de Araújo, Maria Edileuza Felinto de Brito, Juliana Bezerra Medeiros Viana, Joanna Lúcia de Almeida Alexandre, Roberto Pereira Werkhäuser, Éricka Lima de Almeida, Ângela Cristina Rapela Medeiros, Alzira Maria Paiva de Almeida, Sinval Pinto Brandão Filho, Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

Nesse artigo é comparado o desempenho da coleta de amostras de material de lesões de pacientes por método invasivo (biópsia) e não invasivo (*swab*) para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

O estudo envolveu 88 pacientes de área endêmica de LTA do estado de Pernambuco, nordeste do Brasil. De cada paciente foram coletadas amostras pareadas da mesma lesão através de biópsias e por *swab*. As amostras de exsudato coletadas por *swab* e fragmentos de tecido das lesões obtidos por biópsia utilizando *punch* foram analisadas por PCR utilizando *primers* específicos para minicírculos do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* subgênero *Viannia*.

Os resultados foram analisados estatisticamente e permitem concluir que considerando o conforto do paciente, facilidade e segurança na execução, a implementação da coleta de amostras das lesões dos pacientes por *swab* poderá ser recomendada para o diagnóstico da LTA.

Sample collection by cotton swab, a safe non-invasive procedure for American cutaneous leishmaniasis diagnosis

Ana Isabele Freitas de Araújo,^a Maria Edileuza Felinto de Brito,^{a,b} Juliana Bezerra Medeiros Viana,^a Joanna Lúcia de Almeida Alexandre,^a Roberto Pereira Werkhäuser,^a Éricka Lima de Almeida,^a Ângela Cristina Rapela Medeiros,^c Alzira Maria Paiva de Almeida,^d Sinval Pinto Brandão Filho,^a Eduardo Henrique Gomes Rodrigues^{a,*}

^a Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.

^b Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^c Departamento de Dermatologia, Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^d Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: +55 81 96094020; fax: +55 81 21012640.

E-mail addresses: eduardohrodrigues@gmail.com, eduardoh@cpqam.fiocruz.br (E.H.G. Rodrigues).

Abstract

Sample collection procedure for laboratory diagnosis of American cutaneous leishmaniasis (ACL) is crucial, for the current methods are troublesome for both patients and health staff. This study aimed to evaluate a swabbing based collection procedure coupled with polymerase chain reaction (PCR) for ACL diagnosis. Cotton swabs and biopsy samples were obtained in parallel from 88 patients from endemic areas of Pernambuco State, Brazil and were analyzed by PCR targeting kDNA minicircle of *Leishmania* (*Viannia*) spp. 86.4% concordance and 13.6% discordance were observed between the results from the swabbing and biopsy collection procedures. Considering the patient comfort, safety, and easy management the implementation of swabbing collection procedure should be encouraged for sample routine collection for ACL diagnosis. This safe procedure coupled with PCR may contribute for ACL diagnosis and control success in endemic areas.

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

Introduction

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is an infectious disease caused by several *Leishmania* species transmitted by the bite of infected insects of the genus *Lutzomyia*. The spectrum of the clinical manifestations depends on the parasite species involved, the infectious dose, the site of inoculation and the host nutritional and immune status (Beenal et al., 2003; Courret et al., 2003; Ghosn and Kurban, 2008). Humans, exhibit a wide spectrum, from mild to severe, clinical manifestations (Bittencourt et al., 1989); usually occurring the development of single or multiple, dry and crusted or exudative lesions, sometimes unnoticed. The initial lesion may resolve spontaneously or progress to a more severe form of the disease, including treatment resistance.

ACL is distributed worldwide in tropical and subtropical areas mostly in sub-developed countries. It is recorded throughout Brazil where *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the species most commonly associated with the disease. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* prevalent in the North region is also reported in the Northeast, Southeast and Midwest regions (Silveira, et al., 1990; Passos et al., 1999; Brito et al., 2012).

ACL routine diagnosis based mainly on clinical and epidemiological evidence, and microscopic examination of direct smear from dermal scrapings; immunological tests such as Montenegro's intradermal reaction (MIDR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indirect immunofluorescence (IIF) and Western blotting (Eresh et al., 1994; Brito et al., 2012) are complementary tests.

Parasite identification is essential for the correct treatment and epidemiological studies (Escobar et al., 1992; Davies et al., 1997; Rodrigues et al., 2002).

Leishmania identification is performed by multi-locus enzyme electrophoresis (MLLE) or direct immunofluorescence (IF) with a panel of monoclonal antibodies (Shaw et al., 1989; Boité et al., 2012). These techniques are laborious and time consuming, needs high quantity of parasite cells usually obtained by culturing, and are feasible only in specialized centers requiring very skilled professional.

The polymerase chain reaction (PCR) based procedures are highly sensitive allowing the parasites detection directly from samples containing only a few organisms (de Bruijn and Barker, 1992), it is highly specific, preventing the occurrence of cross reaction with other trypanosomatidae and allows species identification by using species-specific primers.

Usually the patient's samples for diagnosis are collected by biopsy. However, this procedure is painful, requiring anesthesia, and it can only be performed by physicians in

nosocomial environment. Furthermore, this invasive procedure lead to the inflammation and secondary bacterial infection. The aim of this study was to compare the performance of swab and biopsy collection samples for ACL diagnosis by PCR.

Material and Methods

Samples collection

Samples were collected from patients from “Zona da Mata region”, coastal area of Pernambuco State and endemic area for *L. (V.) braziliensis*. The patient’s inclusion criteria for the study were epidemiological and clinical evidence for ACL. Samples were collected under sterile conditions in the facilities of Hospital Oswaldo Cruz, Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), Recife, PE, Brazil during the period of March 2011 to June 2012. The project was approved by the Ethics Committee of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE), number 38/2008, and the individuals involved signed an informed consent form.

From each patient parallel samples from the same active lesion were collected by swabbing and biopsy. Swabbing (two samples from each patient) was performed using commercial sterile cotton swab without culture medium moving the swab throughout the lesion surface (Fig. 1). For dry lesions, the swabs were previously soaked into sterile normal (0.8%) saline. Biopsy was carried out from the lesion edge with 5 mm diam. skin-punch under local anesthesia (3% prilocaine chloridrate). Swab samples were stored at 4°C, and biopsy samples at -70°C in 1.5 ml criotubes until use.

DNA extraction and PCR analysis

DNA was extracted directly from a swab cotton tip, turned off the rod, and half of each biopsy sample (5 mm diam. skin-punch) using a commercial kit (QIamp[®] DNA Mini Kit - Qiagen, Valencia, USA) following the manufacturer's instructions. The DNA obtained was suspended in 50 μ L of TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA [pH 8.0]) and stored at - 20°C until use. PCR mixtures were prepared in a 25 μ L volume containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml gelatin, 1.5 mM MgCl, 0.2 mM of deoxynucleoside triphosphate, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech). Two microliters of DNA sample and 25 pmol of each primer: LEIB1 (5'-GGG GTT GGT GTA ATA TAG TGG-3') and LEIB2 (5'-CTA ATT GTG CAC GGG GAG G-3') directed to *Leishmania (Viannia)* spp. kDNA minicircles (de Bruijn et al., 1993; Eresh et al., 1994) were used in the PCR reactions. Thermocycler amplifications were performed in an Eppendorf[®] thermocycler, Master Cycler gradient model as follows: 5 min initial denaturation followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min.

Negative and positive controls included in each PCR run were: PCR mix without DNA as negative control, and 1 ng / μ L and 10 pg / μ L DNA (to detect variations in sensitivity) from the reference strain IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903 *L. (V.) braziliensis* as positive control. 10 μ L of the amplified products were electrophoresed at 6 V/cm in 1% agarose gels in 1X TAE (40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA). Ethidium bromide-stained gels were visualized and photographed under UV and digitalized using a Kodak[®] documentation system, Model 100 Gel Image System Logic.

Results

The study involved a total of 88 patients: 52 males (59.1%) and 36 females (40.9%) aged from seven to 80 years old. Altogether, 176 samples (88 swabs and 88 biopsies) were analyzed by PCR as above described.

Out of the 88 swab samples, 60 (68.18 %) were positive in PCR and 28 (31.42 %) were negative. From the 88 biopsies 68 (77.27 %) were positive in PCR and 20 (22.73 %) were negative.

Of these 176 samples, it was found that: a- 58 were matched to swab and biopsy and positive by PCR; b- 10 samples from biopsy were PCR positives but the parallel swabs were negatives; c- two samples from swab were PCR positives but the parallel biopsies were negatives; d- 18-paired samples from swab and biopsy were PCR negatives.

The comparison of the PCR results showed a compatibility of up to 86% and 13.64% of discordance (Table 1). These data were statistically significant (p value > 0.001). The value obtained from Kappa analysis between the PCR results from swab and biopsy samples (0.66) was substantial. Fig. 2 shows the 750 base pairs (bp) specific amplified segment for *Leishmania* (*Viannia*) spp. kDNA minicircles from representative swab and biopsy samples.

Discussion

Usually biological samples for ACL diagnosis are collected by scraping or biopsy from the edges of active lesions. Biopsy, although the mostly used, is a microsurgical procedure, extremely invasive requiring special pre and post care. Furthermore, this invasive procedure lead to the inflammation and secondary bacterial infection.

Other procedures attempted for samples collection for ACL diagnosis, considered easier and safer, such as the use of sterile toothpicks (Eresh et al., 1994) and the use of cotton swab after removing crust with scalpel blades introduced by Mimori et al., (2002) also lead to active lesions injury.

The skin exudates collection procedure is ticklish particularly for children and facial or other delicate lesion sites unsuitable for biopsy.

Implementation of a noninvasive collection method coupled with a high sensitive and specific diagnosis technique is of the utmost importance for ACL diagnosis.

PCR-based diagnosis procedures from samples collected by different methods are widely used due to the high sensitivity, speed and efficiency compared to other methods, and offer new possibilities and alternatives for clinical and epidemiological studies of leishmaniasis (Landis and Koch, 1977; de Bruijn and Barker, 1992; Mimori et al., 2002).

In the present study, parallel samples from 88 patients were collected by swab and biopsy and analyzed by PCR and the results were compared statistically.

The value obtained from Kappa analysis was 0.66 which, according to Landis and Koch, 1977, is considered substantial. Actually, among the positive and negative results, 86.36% were compatible demonstrating the high efficiency of the swab collection technique. In 13.64% of the cases the results were discordant: in ten cases the biopsy samples were PCR positives and the swab negatives, whereas in two cases the contrary was observed, biopsy negative and swab positives. This divergence (higher biopsy positive results) could be attributed to some shortcomings during swab exudates collection or by the parasites scarcity on the exudates, for the parasite amount is inversely proportional to the infection time length (Rodríguez et al., 1994; Weigle et al., 2002).

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

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

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

In conclusion, the results from the present study proved that the collection of skin lesion exudates by swab for ACL diagnosis is technically feasible and offers several advantages: it can be performed by any health-care, non-physician professional; it does not require anesthesia; and the procedure can be carried out at the patient's home or in an outpatient setting, without the discomfort of patient displacement and hospitalization.

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

Acknowledgements

We thank the Service of Dermatology of the Hospital Oswaldo Cruz, University of Pernambuco (HUOC – UPE, Recife, Pernambuco, Brazil, for the use of its facilities for biological sample collection. We are especially obliged to MSc Cláudio Júlio da Silva for directing patients from endemic areas to the hospital. This work was supported by a grant from the CPqAM/FIOCRUZ-PE and CNPq (PAPES V – 403645/2008-5).

References

- Beenal, K.R., Ramesh, V., Mukherjee, A., 2003. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. *J. Cutan. Pathol.* 30, 616-620.
- Bittencourt, A.A., Barral, A.R., De Jesus, A.R., Almeida, R.P., Grimaldi-Júnior, G., 1989. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 84, 585-586.
- Boité M.C., Mauricio I.L., Miles M.A., Cupolillo E., 2012. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania (Viannia)* parasites based on multilocus sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6, 1888.
- Brito, M.E.F., Andrade, M.S., Dantas-Torres, F., Rodrigues, E.H.G., Paiva-Cavalcanti, M., Almeida, A.M.P., Brandão-Filho, S.P., 2012. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 425-429.
- Courret, N., Lang, T., Milon, G., Antoine, J.C., 2003. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different processes and status protection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 33,1373-1383.
- Davies, C.R., Llanos-Cuentas, E.A., Sharp, S.J., Canales, J., Leon, E., Alvarez, E., Roncal, N., Dye, C., 1997. Cutaneous leishmaniasis in the Peruvian Andes: factors associated with variability in clinical symptoms response to treatment, and parasite isolation rate. *Clin. Infec. Dis.* 25, 302-310.
- de Bruijn, M.H.L., Barker, D.C., 1992. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 52, 45-58.
- de Bruijn, M.H., Labrada, L.A., Smyth, A.J., Santrich, C., Barker, D.C., 1993. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using

- biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. Trop. Med. Parasitol. 44, 201-207.
- Eresh, S., McCallum, S.M., Barker, D.C., 1994. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. Parasitol. 109, 423-433.
- Escobar, M.A., Martinez, F., Scott, S.D., Palma, G.I., 1992. American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (tegumentary): a diagnostic challenge. Trop. Doct. 22, 69-78.
- Ghosn, S.H., Kurban, A.K., 2008. Leishmaniasis and other protozoan infections, in: Wolff, K., Goldsmith, L.A., Katz, S.I., Gilchrest, B.A., Paller, A.S., Leffell, D. (Eds.), Fitzpatrick's dermatology in general medicine. McGraw Hill Inc., New York, pp. 2001-2009.
- Landis, J.R., Koch, G.G., 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 33, 159-174.
- Mimori, T., Matsumoto, T., Calvopiña, M.H., 2002. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. Acta Trop. 81, 197-202.
- Passos, V.M., Fernandes, O., Lacerda, P.A., Volpini, A.C., Gontijo, C.M., Degraive, W., Romanha, A.J., 1999. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Trop. 72, 251-258.
- Rodrigues, E.H.G., Brito, M.E.F., Mendonça, M.G., Werkhäuser, R.P., Coutinho, E.M., Souza, W.V., Militão de Albuquerque, M.F., Jardim, M.L., Abath, F.G., 2002. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. J. Clin. Microb. 40, 3572-3576.
- Rodríguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B.R., Convit, J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J. Clin. Microb. 9, 2246-2252.

- Shaw J.J., Ishikawa E., Lainson R. 1989. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83,783-784.
- Silveira, T.G., Teodoro, U., Arraes, S.M., Lonardoni, M.V., Dias, M.L., Shaw, J.J., Ishikawa, E.A., Lainson, R., 1990. An autochthonous case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Paraná State, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85, 475–476.
- Weigle, K.A., Labrada, L.A., Lozano, C., Santrich, C., Barker, D.C., 2002. PCR-Based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. J. Clin. Microb. 40, 601–606.

Figure Legends

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

Figure 2. PCR products of biopsy and swab samples amplified using specific primers for *Leishmania (Viannia)* spp. kDNA minicircles in ethidium bromide stained 1% agarose gel electrophoresis. Abbreviations: Lanes: M, marker (100-bp ladder, Invitrogen); C⁺⁺ and C⁺: positive controls containing 1 and 0.01 ng of parasite genomic DNA, respectively; C⁻: negative control; 1, 2, 3, 4, 6: positive biopsy samples and 8, 9, 10, 12, 13, 15: positive swab samples. The amplified 750-bp fragment is indicated by the arrow.

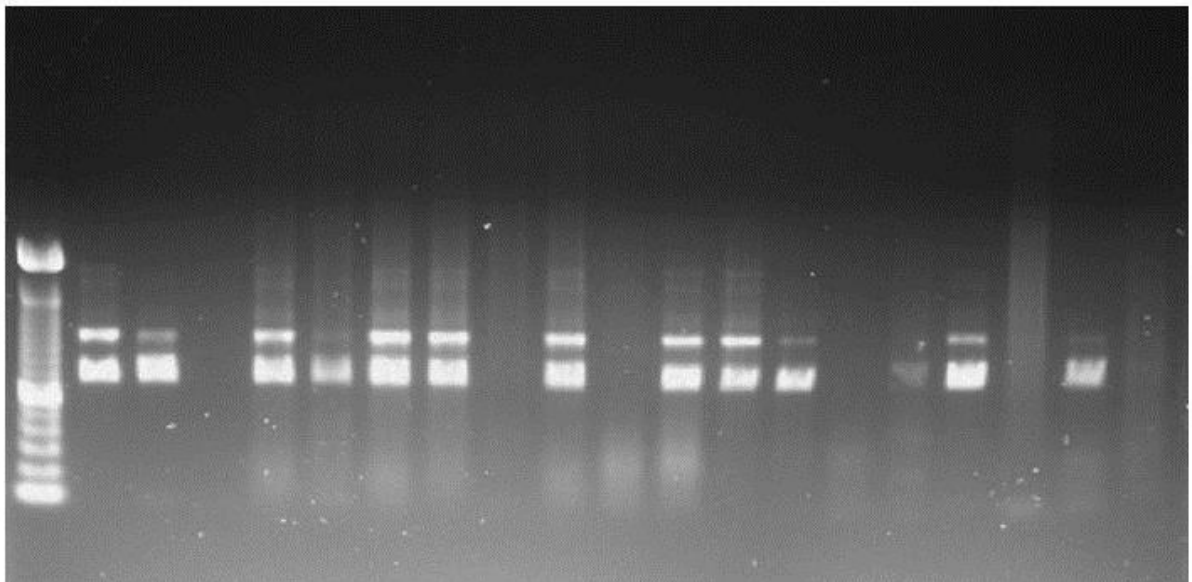
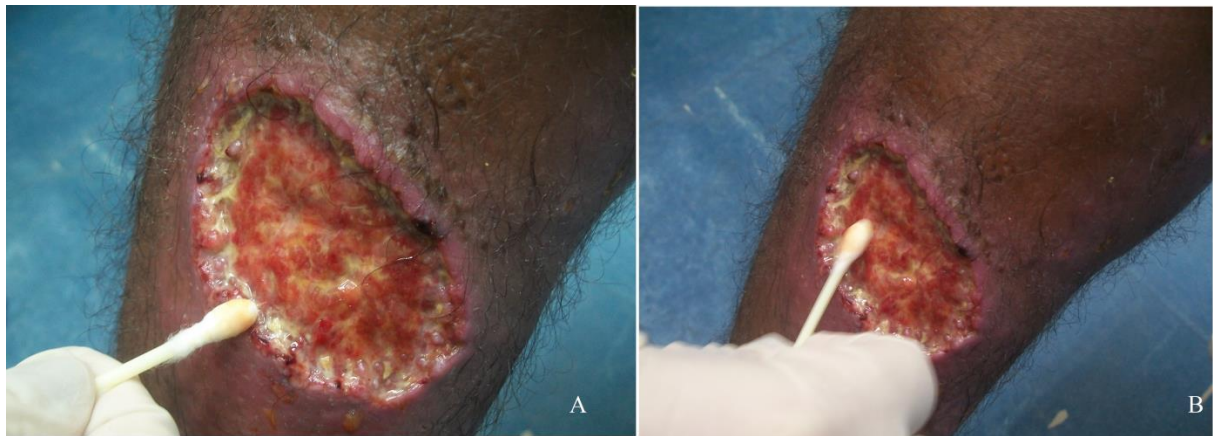


Tabela 1. Comparison of PCR results from biopsy and swab samples.

PCR		Total of agreement between results*	%
Biopsy	Swab		
-	+	18	86.36
+	+	58	
+	-	10	
-	+	2	13.64
Total of samples analyzed		88	100

Note: (+) Positive result; (-) Negative result; (*) Similar result in both samples.

CAPÍTULO V

ARTIGO 4

Sumeter a revista PloS ONE

Avaliação de diferentes métodos para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana

Evaluation of different methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Maria Edileuza Felinto Brito, Ana Isabele Freitas de Araújo, Juliana Bezerra Medeiros Viana, Joanna Lúcia de Almeida Alexandre, Angela Cristina Rapela Medeiros, Roberto Pereira Werkhäuser, Claudio Julio da Silva, George Tadeu Nunes Diniz, Sinval Pinto Brandão-Filho, Alzira Maria Paiva de Almeida, Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

Este artigo apresenta um estudo realizado em 98 pacientes sendo 88 suspeitos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) provenientes de área endêmica e 10 de área não endêmica com outras patologias dermatológicas (grupo controle negativo).

Nos pacientes suspeitos de LTA foram realizadas análises em amostras de material de lesões cutâneas através de técnicas tradicionais parasitológicas e imunológicas: exame direto por microscopia óptica em *imprints*, cultura e inoculação em animal de laboratório, imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e intradermoreação de Montenegro (IDRM).

Apesar de ser considerado o padrão ouro, apenas 70,6 % dos pacientes foram positivos pelo método direto; o maior percentual de positividade (94 %) foi pela IDRM; menor positividade foi obtida pela RIFI (67,6 %) e pela cultura (30,7 %).

Amostras pareadas de cada paciente foram coletadas da mesma lesão através de biópsias e por *swab* e analisadas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de minicírculos do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* subgênero *Viannia*.

Em 58 pacientes as amostras pareadas obtidas por biópsia e *swab* foram positivas pela PCR e em 18 pacientes foram negativas; de 10 pacientes apenas as amostras obtidas por biópsia foram positivas e de dois pacientes apenas as amostras obtidas por *swab* foram positivas.

De acordo com o índice de Kappa a concordância entre os resultados da PCR a partir de amostras coletadas por *swab* e por biópsia foi de 86,36 %, sendo considerada substancial (Kappa = 0,66).

A divergência dos resultados nos 12 pacientes (apenas as amostras coletadas por biópsia foram positivas por PCR em 10 pacientes, e apenas as amostras obtidas por *swab* foram positivas em dois pacientes) pode ser atribuída à baixa quantidade de parasitos nos exsudatos, ou existência de pouco exsudato, uma vez que os parasitos não se encontram uniformemente distribuídos em toda a lesão, podendo haver áreas da lesão sem parasitos, o que pode ocasionar um resultado falso-negativo.

Apesar do exame direto ter se mostrado mais eficiente do que a PCR o procedimento empregado na coleta das amostras das lesões é um procedimento invasivo, exige maior capacitação dos técnicos e sua sensibilidade depende da espécie do parasito envolvido e do tempo de evolução da doença.

A IDRM é um teste bastante utilizado em inquérito epidemiológico, pois aponta contato do indivíduo com o parasito. Apesar de fornecer maior percentual de positividade dentre os testes imunológicos apresenta importantes limitações técnicas para execução e interpretação dos resultados, desconforto para os pacientes e não distingue infecção presente da passada e não reage com os indivíduos imunossuprimidos.

Em conclusão, os estudos revelaram a sensibilidade e a eficácia da combinação entre o procedimento de coleta de amostras por *swab* e a análise por PCR para utilização no diagnóstico da LTA. Dessa maneira, além da segurança e conforto para os pacientes e profissionais o emprego de procedimentos invasivos será reduzido.

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

EVALUATION OF DIFFERENT METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Maria Edileuza Felinto Brito^{1,2}, Ana Isabele Freitas de Araújo¹, Juliana Bezerra Medeiros Viana¹, Joanna Lúcia de Almeida Alexandre¹, Angela Cristina Rapela Medeiros³, Roberto Pereira Werkhäuser¹, Claudio Julio da Silva⁴, George, Sinval Pinto Brandão-Filho¹, Alzira Paiva de Almeida¹, Eduardo Henrique Gomes Rodrigues¹

1 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, 2 Universidade Federal de Pernambuco, 3 Hospital Universitário Oswaldo Cruz, 4 Núcleo de Vigilância Saúde e Ambiente de Moreno PE.

Correspondência: Maria Edileuza Felinto de Brito, MSc, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, 50670-420, Recife – PE, Brasil, (britomef@cpqam.fiocruz.br).

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária complexa, que se destaca por apresentar diferentes formas clínicas e ser de difícil diagnóstico. A definição de caso é feita através de exames clínicos associados aos dados epidemiológicos e laboratoriais. A obtenção de amostras para os testes laboratoriais na sua maioria é feita por métodos invasivos. Neste trabalho a metodologia empregada na coleta de amostras e diagnóstico da LTA foi avaliada objetivando validar um método de coleta não invasivo associado à técnica de PCR, para o diagnóstico da LTA. Estudos realizados em 88 pacientes suspeitos de LTA e 10 com outros tipos de lesões dermatológicas revelaram que a coleta por *swab* para diagnóstico por PCR é uma alternativa válida para o diagnóstico da LTA e poderá contribuir para o sucesso do controle da doença em áreas endêmicas.

Palavras chaves: Leishmaniose tegumentar. Diagnóstico. PCR. Biópsia. *Swab*.

Evaluation of different methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis**Abstract**

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a complex parasite-infectious disease, displaying different clinical forms, and difficult diagnosis. ACL case definition based on clinical examination associated with epidemiological and laboratory data. Usually patients' samples collection for laboratory testing is carried out by using invasive methods. In this work samples collection and diagnosis methodology, was assessed to validate a non-invasive method of sample collection associated with PCR for ACL diagnosis. Studies conducted on 88 ACL suspected patients and 10 patients with other dermatological diseases revealed that the swab collection method is a valid alternative for ACL diagnosis and may contribute to the successful control of the disease in endemic areas.

Key words: *American cutaneous leishmaniasis. Diagnostic. Sample collection. Swab. Biopsy. PCR.*

Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma parasitose complexa por apresentar diversas manifestações clínicas e diferentes padrões epidemiológicos de ciclo de transmissão. O diagnóstico laboratorial da LTA é de fundamental importância, em virtude das dificuldades para a definição dos casos, que envolve os diagnósticos diferenciais com outras dermatoses granulomatosas e aos sérios efeitos colaterais dos medicamentos utilizados para o tratamento dos pacientes [1,2].

O diagnóstico convencional é feito através da visualização do parasito por microscopia óptica em esfregaços ou *imprints*, exames histopatológicos, além de cultura em meio específico e inoculação em animal de laboratório [3,4], a partir de fragmentos de amostras teciduais coletadas das lesões por escarificação ou por biópsia. Exames imunológicos como, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA e Western blotting, e a intradermoreação de Montenegro (IDRM), são métodos indiretos que também auxiliam no diagnóstico [1,5].

Esses procedimentos apresentam sensibilidade variada dependendo de fatores como o tempo de evolução da lesão, a espécie de *Leishmania* envolvida e as manifestações clínicas [1]. O exame direto é considerado “padrão-ouro” para o diagnóstico da LTA [6,7].

A PCR tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de LTA [8,9] apresentando alta sensibilidade e especificidade [9,10], principalmente quando realizada em amostras de biópsias [11]. Entretanto esses resultados variam de acordo com as condições do operador e do laboratório [3].

O diagnóstico rápido e preciso da LTA por permitir o tratamento correto e precoce, pode contribuir para a melhoria do planejamento das ações e medidas de controle da doença [1] e para isso é necessário, além de métodos eficazes de identificação do parasito o emprego de procedimentos simples, seguros e de fácil execução para a coleta das amostras.

Uma importante limitação no diagnóstico da LTA é a coleta das amostras que emprega métodos invasivos que causam desconforto para o paciente e é particularmente de difícil execução em crianças e quando a lesão está localizada na face e ou em outras partes delicadas do corpo do paciente. Além disso, procedimentos como a biópsia exigem técnicos especializados e pode ser feita apenas por especialista em ambiente hospitalar, e ainda pode aumentar o risco de infecções secundárias por bactérias.

A coleta de exsudatos das lesões cutâneas por meio de *swab* é um procedimento não invasivo [12], de rápida e fácil execução. A utilização deste método permite a coleta de exsudato em toda extensão da lesão, pode ser de uso pediátrico e feito por um técnico qualificado na própria residência do paciente sem necessidade de deslocamento. Pela simplicidade, a coleta de amostra por *swab*, associada à alta sensibilidade e especificidade da PCR poderá contribuir para aperfeiçoamento do diagnóstico da LTA e auxiliar a rotina de diagnóstico nos serviços de saúde. Nesse sentido o presente estudo valida o método de coleta não invasivo por *swab* associado à técnica de PCR, para o diagnóstico da LTA.

Métodos

Tipo de estudo: Seleção de pacientes por conveniência.

Pacientes: O estudo envolveu 88 pacientes com sinais clínico e histórico epidemiológico de LTA procedentes de área endêmica, e 10 pacientes com outras patologias dermatológicas (úlceras de estase, úlcera tropical, úlceras traumáticas, hanseníase, esporotricose, tuberculose e neoplasias cutâneas) de área não endêmica para LTA. O diagnóstico clínico-epidemiológico com base na anamnese, características das lesões e dados dos pacientes (sexo, faixa etária, ocupação e procedência) foi realizado pelo dermatologista do ambulatório do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC), Recife - PE, Brasil. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE) licença N° 41/08.

Os pacientes que participaram da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Coleta das amostras. De cada paciente foram coletadas amostras pareadas da mesma lesão (1): utilizando *swabs* de algodão estéreis obtidos comercialmente, acondicionados em tubos sem meio de cultura (Absorve), para a coleta do exsudato das lesões, (2) utilizando *punch* de 5mm (Fisher Scientific NC9151828) para obtenção de fragmentos de tecido das lesões (biópsia). Também foi obtido material de raspado da borda da lesão, e sangue venoso.

A coleta por *swab* foi realizada em toda a área das lesões ulceradas; nas ressecadas e/ou que não apresentavam exsudatos utilizou-se *swab* umedecido com soro fisiológico estéril; e nas crostosas a lesão foi previamente umedecida com compressa de gaze umedecida com soro fisiológico estéril, procedendo em seguida à retirada de uma pequena parte da crosta, preferencialmente da borda, a partir da área exposta foi feita a coleta do exsudato com *swab*. Os *swabs* foram estocados -20°C.

As biópsias cutâneas foram realizadas utilizando *punch* de 5 mm de diâmetro. Os fragmentos foram retirados da borda da lesão, após antissepsia com clorexidina a 2 % e infiltração anestésica local com lidocaína a 2%. Logo após a coleta cada fragmento (5mm) de tecido das lesões obtido por biópsia foi dividido ao meio com lâmina de bisturi nº 11. Uma parte foi processada em cultura, e a outra parte estocada em criotubos a temperatura de -20°C para análise por PCR.

Raspados da borda da lesão foram realizados com o auxílio de lâmina de bisturi estéril, previamente higienizada com soro fisiológico estéril e, com o material obtido foi feito esfregaço em duas lâminas microscópicas para exame direto.

De cada paciente foi coletado 5mL de sangue venoso para a obtenção de soro que foi estocado a -20°C até o uso. As amostras coletadas foram transportadas em caixas com gelo sob refrigeração para o Serviço de Referência em Leishmaniose da FIOCRUZ – PE.

Pesquisa direta. Os esfregaços (após secagem) foram fixados com metanol, corados com solução de Giemsa por 25 minutos e examinados em microscópio óptico com aumento de 100x.

Cultura. Fragmentos de tecidos obtidos por biopsia foram picotados por bisturi e suspensos em 500µl de salina estéril contendo 1 % de penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL, SIGMA®). 400µl foi inoculado em 4mL de meio NNN/modificado por Walton (1977) e incubado a 26°C. A cultura foi examinada em intervalo de cinco dias durante 20 dias para a visualização de promastigotas [14].

Cem microlitos (100µL) do material foram inoculados por via intraperitoneal em hamsters (*Mesocricetus auratus*). Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas e observados

durante três meses no Biotério de Experimentação Animal da FIOCRUZ - PE. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO² e colhidas amostras de tecidos (pele, baço e fígado). Com os fragmentos do fígado foram feitos esfregaços em lâminas, como descrito acima para exame microscópico direto. Com o fragmento do baço foram feitos *imprints* por aposição em lâminas para exame microscópico e semeio em meio de cultura (NNN/modificado) como descrito acima para o isolamento e/ou recuperação do parasito. O procedimento teve autorização da Comissão Ética de Uso de Animais (CEUA), FIOCRUZ – PE (Nº 17/10).

Caracterização dos parasitos. Os isolados obtidos por cultura ou inoculação em hamster foram identificados em nível de espécie através de RIFI usando anticorpos monoclonais específicos anti-*Leishmania* e eletroforese de enzimas multilocus (MLEE) segundo descrito anteriormente [15-17].

Exames imunológicos. Pacientes foram submetidos a IDRM utilizando antígeno produzido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos-CPPI-Paraná seguindo as instruções do fornecedor. A leitura da reação foi feita após 48 h pelo método Socal [18], considerando positivo a enduração com ≥ 5 mm de diâmetro.

Amostras de soro de 69 pacientes foram analisadas por RIFI utilizando o kit RIFI–Leishmaniose Humana produzido por Biomanguinhos seguindo instruções do fornecedor. Foram utilizados dois soros padrões (positivos e negativos) na diluição de 1:40, tendo sido considerado positivos aqueles que resultaram em fluorescência de *Leishmania* sp. nas lâminas a uma diluição sérica de 1:40.

Análise por PCR. O DNA das amostras foi extraído diretamente a partir dos *swabs*, separados das hastes, e metade de cada amostra de biópsia (*punch* 5 mm diam), utilizando *kit* comercial (QIamp ® DNA Mini Kit - Qiagen, Valencia, EUA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de DNA obtidas foram suspensas em 50 µl de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0) e armazenadas - 20 ° C.

As reações de PCR para amplificação de um segmento de 750 pares de base (pb) do kDNA para o subgênero *Viannia* foram realizadas como descrito [4].

Análise estatística. Os dados obtidos foram processados e analisados através do programa estatístico OpenEpi V.2.3 - <http://www.openepi.com/OE2.3/Menu/OpenEpiMenu.htm> R – <http://www.r-project.org>.

Para identificação dos verdadeiros positivos foi calculada a sensibilidade e para os verdadeiros negativos a especificidade, verificando a acurácia em relação aos testes de diagnóstico; os valores preditivos positivos e negativos também foram calculados. O Teste

Kappa [19] foi utilizado para avaliação da concordância entre os testes de diagnóstico. Todas as conclusões foram tomadas em nível de significância de 5%.

Resultados

Diagnóstico clínico e epidemiológico dos pacientes. Dos 88 pacientes do estudo, com lesão de LTA, 52 (59,1 %) eram do sexo masculino e 36 (40,9%) do sexo feminino. A idade variou de sete a 80 anos sendo a faixa etária mais acometida a de 31-50 anos.

De acordo com as manifestações clínicas, 86 (92,59 %) pacientes apresentavam a forma cutânea localizada, um paciente era portador de leishmaniose disseminada (56 lesões) e outro estava co-infectado (HIV/LTA).

Quanto às características das lesões, 91,0 % dos pacientes apresentaram lesões ulceradas, 7,95 % lesões crostosas, e 1,13 % lesão úlcera papulosa (Tabela 1). O período de evolução da lesão variou de oito dias a dois anos, sendo em média de 2,2 meses.

Tabela 1: Distribuição dos resultados da PCR em amostras pareadas coletadas por *Swab* e por *Biópsia* nos diferentes tipos das lesões dos pacientes.

Tipo de lesão	Nº	Swab		Biópsia	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Ulcerada	80	52	28	61	19
Crostosa	7	7	0	6	1
Pápula-ulcerada	1	1	0	1	0

Diagnóstico Parasitológico. Através do exame microscópico direto dos esfregaços em lâmina de material obtido por raspado da borda da lesão nos 88 pacientes, 62 (70,4%) foram positivos. No total 27 pacientes (30,7%) foram positivos por cultura *in vitro* e *in vivo*; das amostras coletadas por biópsia nos 88 pacientes e cultivadas *in vitro* e *in vivo* foram isoladas 27 cepas: 16 pelo semeio no meio de cultura 11 pela inoculação em hamster. Os isolados foram caracterizados como *L. (V.) braziliensis* através de análise de isoenzimas e anticorpos monoclonais.

As culturas foram preservadas em meio de cultura com 8 % de glicerol em criotubos em nitrogênio líquido (-196°C) no Banco de Cepas do SRL da FIOCRUZ - PE e depositadas na Coleção de Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), Rio de Janeiro e no Instituto Evandro Chagas em Belém do Pará.

Diagnóstico imunológico. A prova de IDRM foi realizada em 50 dos 88 pacientes do estudo, e desses 47 (94 %) foram positivos (Tabela 2).

A RIFI para detecção de anticorpos específicos anti - *Leishmania* spp. foi realizada em 69 dos 88 pacientes do estudo e desses 46 (68,11%) foram positivos (Tabela 2).

Diagnóstico por PCR. Através das reações para amplificação do kDNA do subgênero *Viannia*, por PCR, um total de 70 pacientes (79,5%) se revelaram positivos; houve amplificação do segmento do tamanho esperado (750 pb) em 68 amostras (77,3%) obtidas por biópsia e 60 (68,2%) por *swab*.

A PCR foi positiva nas amostras pareadas obtidas por biópsia e *swab* de 58 pacientes, e negativa nas amostras pareadas obtidas por biópsia e *swab* de 18 pacientes; de 10 pacientes apenas as amostras obtidas por biópsia foram positivas e de dois pacientes apenas as amostras obtidas por *swab* foram positivas.

Das amostras pareadas coletadas em 80 pacientes apresentando lesões ulceradas, 52 amostras obtidas por *swab* e 61 obtidas por biópsia mostraram-se positivas por PCR; as amostras obtidas por *swab* de sete pacientes com lesões crostosas e seis obtidas por biópsia foram positivas, e as amostras pareadas obtidas por *swab* e biópsia em um paciente com lesão pápula ulcerada foram positivas por PCR (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados dos diferentes testes diagnósticos (Exame direto, PCR, IDRM, RIFI, Cultura *in vitro* e *in vivo*) nos pacientes do estudo.

EXAMES		Nº examinado	Nº Positivos	% Positivos
Pesquisa direta		88	62	70,6
PCR	Swab	88	60	68,2
	Biópsia	88	68	77,3
	TOTAL*	88*	70*	79,5*
IDRM		50	47	94,0
RIFI		69	46	67,6
Cultura <i>in vitro</i>		88	16	18,2
Cultura <i>in vivo</i>		88	11	12,5
Cultura TOTAL**		88	27	30,7

Total*: resultados combinados *swab* + biópsia

Cultura TOTAL**: resultados combinados Cultura *in vitro* + *in vivo*

A análise da concordância dos resultados da PCR nas amostras coletadas por biópsia e por *swab*, pelo teste kappa, mostrou conformidade em 86,37. O valor obtido dessa concordância foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

O exame direto, considerado padrão ouro para diagnóstico de LTA, foi positivo em 62 (70,6%) amostras dos 88 pacientes. Das 88 amostras obtidas por *swab* 60 (68,2%) foram positivas por PCR. De acordo com o tipo de lesão, a pesquisa direta mostrou-se eficiente, sendo o parasito detectado em lesões ulceradas, crostosas e pápula ulcerada.

Os resultados da pesquisa direta revelaram 74,19% de sensibilidade, 46,15% de especificidade, 65,91% de acurácia e IC de 55,53-74,96 %. O valor preditivo positivo foi de 76,67 % e a razão de verossimilhança de 1,378 para um resultado de teste positivo e de 0,5591 para um teste negativo.

A análise dos resultados do diagnóstico por PCR em material obtido por *swab* e biópsia forneceu 85,29% de sensibilidade, 90% de especificidade, 86,36% de acurácia, e o IC 95%, foi de 77,39-92,75%. O valor preditivo positivo foi de 96,67% e a razão de verossimilhança foi de 8,5290 para um resultado de teste positivo e de 0,1634 para um resultado de teste negativo.

DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou a sensibilidade e a eficácia da combinação entre o procedimento de coleta de amostras por *swab* e a análise por PCR para utilização no diagnóstico da LTA. Através da análise por PCR em material coletado por *swab* 60 de 88 amostras (68,2%) foram positivas, e por exame direto de esfregaço 62 de 88 pacientes foram positivos (70,6%). Apesar do exame direto ter se mostrado mais eficiente o procedimento empregado na coleta das amostras das lesões é um procedimento invasivo. O exame direto, padrão-ouro para o diagnóstico da LTA, apesar de rápido e fácil, exige técnicos capacitados [3] e sua sensibilidade depende da espécie do parasito envolvido e do tempo de evolução da doença.

A concordância entre o teste de PCR a partir de amostras coletadas por *swab* e biópsia foi considerada substancial (Kappa = 0,66), conforme índice de Kappa de Cohen [19]. O valor desse índice demonstra a eficácia significativa da técnica de coleta por *swab* em relação à biópsia [19]. A divergência dos resultados pode ser atribuída à baixa quantidade de parasitos nos exsudatos, ou existência de pouco exsudato, uma vez que estes não se encontram dispostos de forma uniforme na lesão, podendo existir áreas da lesão onde não haja a presença de *Leishmania*, o que pode conduzir a um resultado falso-negativo. Como descrito anteriormente, a quantidade de parasitos nas lesões é inversamente proporcional à duração da infecção [20] e lesões ressecadas e/ou crostosas são pobres em exsudato. Entretanto nesse trabalho a característica das lesões não pareceu influenciar os resultados.

Estudos prévios demonstraram a elevada sensibilidade da PCR em material de raspagem de lesão em relação ao exame direto de esfregaço. A PCR além de ser capaz de detectar pequena quantidade de DNA dos parasitos em amostras de biópsia pode identificar a espécie do parasita sem necessidade de cultivo [9].

Nesse trabalho a positividade total por PCR das amostras obtidas em paralelo por *swab* e biópsia (70 amostras = 79,5%) foi superior a do exame direto (62/88 = 70,6%).

A amplificação por PCR do DNA de *L. (V.) braziliensis* pode ser realizada a partir de amostras de sangue de pacientes [21], entretanto a sensibilidade da PCR em sangue revelou-se baixa em comparação as amostras de biópsia de tecido, devido à escassez de parasitos circulantes [21], além disso, a coleta de sangue é um processo invasivo. Amplificação do DNA de *L. (V.) braziliensis* também pode ser realizada em amostras de saliva de pacientes de LTA. A presença do parasito na saliva pode ser atribuída ao tropismo das espécies do subgênero *Viannia* [22].

A presença dos parasitos envolvidos na leishmaniose visceral (LV) tem sido detectada em amostras de tecidos, sangue, urina, fezes e a partir de amostras coletadas por *swab* de secreções orais e nasais [22]. Strauss-Ayali et al., (2004), comparando os resultados dos exames de material

coletado por *swab* da conjuntiva de cães e amostras coletadas por métodos convencionais, inclusive a biópsia de tecido canino, concluíram que a coleta de amostras por *swab* associada ao diagnóstico por PCR pode ser uma alternativa para estudos epidemiológicos da LV canina [24,25] e no futuro este procedimento poderá substituir a punção medular tradicional evitando risco e desconforto para os animais.

No presente estudo, os resultados das culturas *in vivo* e *in vitro* ($27/88 = 30,68 \%$), e da RIFI ($46/68 = 67,6 \%$) foram inferiores aos do exame direto ($62/88 = 70,6 \%$).

A IDRM foi positiva em 47/50 pacientes (94%) corroborando o diagnóstico clínico-epidemiológico. A IDRM tem grande valor no diagnóstico presuntivo de LTA, sendo considerado um bom indicador para inquérito epidemiológico e permite o diagnóstico diferencial entre as doenças dermatológicas [26].

A RIFI é uma técnica sensível que apresenta especificidade variável (66 a 71%) na forma cutânea e 100% na forma mucosa [5,34]. Os resultados obtidos no presente estudo foram inferiores aos do padrão-ouro. As diferenças na especificidade e sensibilidade podem ser atribuídas a baixos níveis de anticorpos circulantes ou a reduzida antigenicidade dos parasitos [5,28].

A cultura embora seja o método de diagnóstico mais específico para LTA [30,31], quanto à sensibilidade os resultados são discrepantes e a positividade das culturas pode variar de 13 a 90% [32,33]. Entre os fatores responsáveis dessa variabilidade apontam-se: diferentes meios de cultura utilizados e a diferença entre as espécies de *Leishmania* envolvidas [3]. No nosso estudo os resultados das culturas *in vitro* e *in vivo* ficaram muito abaixo do padrão-ouro e dos outros testes em geral.

Métodos alternativos de coleta de amostras biológicas para diagnóstico de LTA têm sido buscados com o objetivo de minimizar o desconforto dos pacientes. Alguns procedimentos como impressão em papel de filtro uso de escova citológica, palitos de madeira, para coleta de material de lesões para diagnóstico da LTA por PCR forneceram valores de sensibilidade entre 95 a 99%, superior ao de exame direto em lâminas cuja sensibilidade foi de 47,9 % [12,34-36]. No entanto, a coleta utilizando palito de madeira e bisturis apresentam o inconveniente do uso de material perfuro-cortante.

Esses resultados demonstram que a obtenção de amostras pelo método não invasivo por *swab*, associada aos testes moleculares pode representar um avanço substancial no diagnóstico laboratorial da LTA. Esse método: (a) evita o deslocamento do paciente, (b) pode ser realizado por diferentes profissionais devidamente habilitados, (c) pode ser utilizado em diferentes faixas

etárias, (d) é o mais seguro no ato da obtenção da amostra, e (e) possibilita o fácil transporte da amostra.

O método de coleta por *swab* associado à técnica de PCR para o diagnóstico da LTA proposto no presente estudo é sensível, específico, fácil de execução e oferece segurança, conforto para os pacientes e profissionais de saúde, podendo ainda reduzir o número de coletas invasivas.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que concordaram em participar desse estudo. Ao pessoal do setor de Dermatologia do HUOC onde os pacientes foram atendidos e que realizaram a coleta das amostras para o estudo e ao Prof. Tetsuo Tashiro pelas suas considerações em estatística.

REFERÊNCIAS

1. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*. 36:71-80, 2003.
2. Alvar J., *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS ONE*, San Francisco, 7:01-12, 2012.
3. Kar K, Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit. Rev. Microbilo.*, 21(2):123-152, 1995;
4. De Bruijn M.H; Barker D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica*, Basel, 1: 45-58, 1992
5. Brito, M.E.F, *et al.* Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by imunoblot analysis. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* Washington, 2:318-321, 2000.
6. Costa, J. M. L. Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in cutaneous lesions. *Rev Soc Bras Med Trop*, Rio de Janeiro, 23(4):205-208, 1990.
7. Vega-López, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, Londres, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.
8. De Oliveira, C.I. *et al.* Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infects Dis*, Chicago, 37:149-153, 2003.
9. Belli, A., *et al.* Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am Journ of Trop Med and Hyg*, Baltimore, 58:102-109, 1988.

10. Avilles et al. Detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: A comparison with classical diagnostic methods, *Journ of Parasitol*, Lawrence, 2:181-187, 1999.
11. Rodrigues, E.H.G., et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *Journ Clin Microbiol*, Washington, 4:3572-6, 2002.
12. Mimori, T., et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop*, Basel, 81:197-202, 2002.
13. Walton, B. C.; Shaw, J. J.; Lainson, R. Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. *Journ Parasitol*, Lawrence, 63:1118-1119, 1977.
14. Evans, D. **Handbook on isolation characterization and cryopreservation of *Leishmania***. Geneva: World Health Organization, 1989.
15. Cupolillo, E, Grimaldi, G, Momen, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*, Baltimore, 1994;50:296–311
16. Shaw J.J., Ishikawa E, Lainson, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*83:783–4, 1989
17. Brito, M.E.F. et al. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Internat Health*, 14:1278-1286, 2009.
18. Sokal, J.E. Measurement of delayed skin-test responses. *New Engl Journ Med*. 293:501-502, 1975
19. Landis, J.R., Koch G G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159-174, 1977
20. Rodriguez, N., et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journ Clin Microbiol*, 32(9):2246-52, 1994
21. Martins, L. Alexandrino, A., Guimarães G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American Tegumenatry Leishmaniasis patient. *Rev Saúde Púb*, São Paulo, 3:1-4, 2010
22. Corvalan, F.H., DNA identification of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis,of *The Journ Venom Anim and Toxins including Trop Dis*, 17: 98-102, 2011

23. Forkner, C.E., ZIA, L. S. Viable *Leishmania donovani* in nasal and oral secretion of patients with Kala-azar and the bearing of this finding on the transmission of the disease. *Journ Experiment Med*, 4:491-499, 1934.
24. Strauss-Ayali, D. et al. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *The Journ of Infec Dis*, Chicago, 9:1729-1733, 2004.
25. Lombardo, G. et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. *Veter Parasitol*, Amsterdam, 1:10-17, 2012.
26. Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, et al. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol*, 116:127-32, 1999.
27. Romero GA, de la Gloria Orge Orge M, de Farias Guerra MV, et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop*, 93:49-56, 2005.
28. Mendonça, S.C.F, et al. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. *Mem Inst Osw Cruz*, 83:347-355, 1988.
29. Brito, M.E.F. et al. Dynamics of the antibody response in patients with therapeutic or spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis. *Trans Royal Soc Trop Med and Hyg*, Londres, 2:203-206, 2001.
30. Bensoussan, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Journ Clinl Microbiol*, Washington, 4:1435-1439, 2006.
31. Rodríguez-González, I. et al. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Experim Parasitol*, Nova Iorque, 1:44-51, 2006.
32. Cuba, C.A.C. et al. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. *Epidem Bull Amer Health Org*, Washington, 15:249-259, 1981.
33. Weigle, K.A. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *Amer Jour Trop Med Hyg*, Baltimore, 3:489-496, 1987.
34. Garcia, A.L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg*, Londres, 4:368-371, 2007.
35. Boggild A.K. et al. Non-invasive cytology brush PCR diagnostic testing in mucosal leishmaniasis: Superior Performance to conventional biopsy histopathology. *PloS ONE*, 10:226395, 2011.

36. Valência B.M. et al. Non-invasive cytology brush PCR for the diagnosis and causative species identification of americana cutaneous leishmaniasis in Peru. *PloS ONE*, 11:49738; 2012.

CONCLUSÕES

O presente estudo contribui para: 1) Ordenar e ampliar o conhecimento técnico científico sobre todos os aspectos clínicos e epidemiológicos da LTA em Pernambuco; 2) O uso combinado do método de coleta por *swab* e a técnica de PCR de amostras de lesões cutâneas para o diagnóstico de leishmaniose é sensível, específico e de substancial concordância. 3) Oferecer aos pacientes e profissionais da saúde um método de coleta prático e seguro; 4) O método proposto no presente trabalho permite que pequenos centros de saúde possam realizá-lo de forma rápida, fácil e a um custo mais baixo.

APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente**Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde**

Centro de Pesquisas

AGGEU MAGALHÃES**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Paciente**

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

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

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

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

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

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

Assinatura do paciente ou menor_____
data_____
Assinatura do responsável_____
data_____
Assinatura do médico responsável – CPqAM/Fiocruz_____
data

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

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 2101 2500; Fax: (081) 2101 2640; <http://www.cpqam.fiocruz.br>.

APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle**Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde**

Centro de Pesquisas

AGGEU MAGALHÃES**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Grupo Controle**

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

Eu,, concordo em participar voluntariamente neste projeto que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). Fui informado que o objetivo principal do referido projeto é melhorar o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana a partir de um método que não utiliza material que corte a pele, para identificação de *Leishmania* spp. Eu farei parte do grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Serei submetido a uma única coleta com a utilização de hastes flexíveis (cotonetes), sob condições estéreis, em toda a área da lesão. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-lo.

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

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

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

Assinatura do paciente ou menor_____
data_____
Assinatura do responsável_____
data_____
Assinatura do médico responsável – CPqAM/Fiocruz_____
data

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

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Cx. Postal 7472, CEP: 50670-420, Recife – PE, Brasil. Tel.: (081) 2101 2500; Fax: (081) 2101 2640; <http://www.cpqam.fiocruz.br>.

APÊNDICE C – FICHA DE CADASTRO DE PACIENTE

Departamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Cadastro do paciente leishmaniótico: informações relevantes

Data: _____ No.do registro: _____
 Paciente: _____ Data de nasc.: _____
 Profissão: _____ Endereço: _____

Testes imunológicos:

Teste de Montenegro: _____ mm	IFI:	ELISA:	Immunobloting:
----------------------------------	------	--------	----------------

Características das lesões:

Cutânea	Mucosa	Cutâneomucosa	Linfonodo regional
---------	--------	---------------	--------------------

Descrição: Tempo de evolução, primária ou recidivante, número, localização e diâmetro, tipo ulcerada, vegetante, nodular, outros: _____

Material biológico coletado

EXAME	RESULTADO
1. Biópsia	Amastigotas presentes? Reação granulomatosa e linfoproliferativa?
2. Histopatologia	
2. Pesquisa direta em esfregaço	
a) Raspado:	
b) Imprint de biópsia:	
3. Cultura (especificar meio de cultura)	Cultivar até 30 dias e registrar dia posituação (5, 15, 30)
a) De biópsia:	
b) De punção:	
4. Tipagem (especificar tipo): Isoenzimas: Monoclonais: Genotipagem:	
5. Outros: Reação em cadeia da polimerase (PCR)	

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

Título do Projeto: Validação do método Swab para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de área endêmica de Pernambuco, Brasil.
Pesquisador responsável: Eduardo Henrique Gomes Rodrigues
Instituição onde será realizado o projeto: Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ)
Data de apresentação ao CEP: 20/05/2008
Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ: 41/08
Registro no CAAE: : 0040.0.095.000-08

PARECER N° 38/2008

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

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

Recife, 22 de julho de 2011


Dra. Giselle Camposana Gouveia
Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ



Campus de UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1611 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedeetica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B: COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 3

Dear Dr. Maria Edileuza Felinto de Brito,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Experimental Parasitology

Title: Sample collection by cotton swab, a safe non-invasive procedure for American cutaneous leishmaniasis diagnosis Corresponding Author: Eduardo Rodrigues

Co-Authors: Ana Isabelle Freitas de Araújo, MSc; Maria Edileuza Felinto de Brito, MSc; Juliana Bezerra Medeiros Viana, BSc; Joanna Lúcia de Almeida Alexandre, BSc; Roberto Pereira Werkhäuser, MSc; Éricka Lima de Almeida, BSc; Ângela Cristina Rapela Medeiros, Ph.D.; Alzira Maria Paiva de Almeida, Ph.D.; Sinval Pinto Brandão Filho, Ph.D.;

We would like to invite you to link your ORCID to this submission. If the submission is accepted, then your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and will be updated on your ORCID account.

To go to a dedicated page in EES where you can link an existing ORCID, or sign-up for an ORCID, please click the following link:

<http://ees.elsevier.com/ep/1.asp?i=45711&l=KVCZ35D6>

Please note: If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at eduardohrodrigues@gmail.com;eduardoh@cpqam.fiocruz.br.

What is ORCID?

"ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers."

<http://www.ORCID.org>

More information on ORCID can be found on the ORCID website,

<http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page:

http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Thank you,

Experimental Parasitology

ANEXO C: NORMAS PARA SUBMISSÃO NA REVISTA EXPERIMENTAL PARASITOLOGY



EXPERIMENTAL PARASITOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

ISSN: 0014-4894

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.1
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.3

DESCRIPTION

Experimental Parasitology emphasizes modern approaches to **parasitology**, including **molecular biology** and **immunology**. The journal features original research papers on the physiological, metabolic, immunologic, biochemical, nutritional, and chemotherapeutic aspects of **parasites** and **host-parasite relationships**.

Most downloaded papers

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Parasitologists, microbiologists, molecular biologists and biochemists working with parasites as a model

ABSTRACTING AND INDEXING

Abstracts in Hygiene and Communicable Diseases

BIOSIS

Elsevier BIOBASE

Chemical Abstracts

Current Contents/Life Sciences

MEDLINE®

EMBASE

Helminthological Abstracts

Pascal et Francis (INST-CNRS)

Protozoological Abstracts

Reference Update

Tropical Diseases Bulletin

Scopus

EDITORIAL BOARD

Co Editors-in-Chief:**Anton Aebischer**, Berlin, Germany, Email: T_Aebischer@t-online.de**Bernd Kalinna**, Parkville, Victoria, Australia, Email: bernd.kalinna@unimelb.edu.au**Editorial Board:****J. Cable**, Cardiff, UK**P. Craig**, Manchester, UK**W. de Souza**, Rio de Janeiro, Brazil**R. Docampo**, Athens, Georgia, USA**M. Doenhoff**, Nottingham, UK**E. Dumonteil**, Yucatán, Mexico**H. Garcia**, Urb. Ingenieria, S.M.P, Peru**P. Geldhof**, Merelbeke, Belgium**G.N. Gobert**, Brisbane, Queensland, Australia**S.B. Gould**, Düsseldorf, Germany**E. Grisard**, Florianópolis, Brazil**M.-J. Gubbels**, ,**A. Hemphill**, Bern, Switzerland**J. Horton**,**M. Hu**, Wuhan, China**A. Klion**, Bethesda, Maryland, USA**J. Kurtz**, Münster, Germany**M. Lalle**, Roma, Italy**K. Matuschewski**, Berlin, Germany**S. Moreno**, Athens, Georgia, USA**A.J. Nisbet**, Edinburgh, Scotland, UK**N.C. Peters**, Bethesda, Maryland, USA**M. Riscoe**, Portland, Oregon, USA**L. Robertson**, Oslo, Norway**M.H. Rodriguez López**, Cuernavaca, Mexico**U. Ryan**, Murdoch, Western Australia, Australia**B. Sinden**, London, UK**F. Villalta**, Nashville, Tennessee, USA**J Walochnik**, Vienna, Austria**M. Wiese**, Glasgow, Scotland, UK**L. Xiao**, Atlanta, Georgia, USA**X.Q. Zhu**, Lanzhou, Gansu, China

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

[ypyw-gfa-banner.gif](#) your paper your way

INTRODUCTION

Experimental Parasitology emphasizes modern approaches to parasitology, including molecular biology and immunology. The journal features original research papers on the physiological, metabolic, immunologic, biochemical, nutritional, and chemotherapeutic aspects of parasites and host-parasite relationships.

Authors of studies on anti-microbial properties of natural substances are strongly encouraged to submit their work to other, more appropriate journals unless the studies have a strong focus on anti-parasitic activity and address the following points: the chemical characterization of the compounds likely implicated to a reasonable degree controls for the effects of vehicles and solvents if an animal model is not investigated or not available, in vitro activity studies that include at least comparative cytotoxicity data using host cells or tissues to show selective anti-parasitic activity at a level that could indicate a realistic prospect for translation, some investigation into the potential mode of action or effects on likely molecular targets in parasites

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open Access and Subscription.

For Subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For Open Access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription	articles	please	see
http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities .			
Open access articles please see http://www.elsevier.com/OAauthoragreement .			

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An Open Access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No Open Access publication fee

All articles published Open Access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide Open Access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published Open Access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The publication fee for this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Vitae - no photos

Include in the manuscript a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail (the PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use). For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. For detailed instructions on the preparation of electronic artwork, please visit <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs at <http://www.elsevier.com/authorFAQ> and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

ANEXO D: NORMAS PARA SUBMISSÃO NA REVISTA PLoS ONE

Plos Neglected Tropical - Author Information

Preparation of Research Articles

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions. Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in English. Authors who do not use English as a first language may contact us for additional information. As a step towards overcoming language barriers on acceptance of the paper, we encourage authors fluent in other languages to provide copies of their full articles or abstracts in other languages. We will publish these translations as supporting information and list them, together with other supporting information files, at the end of the article text.

Cover Letter

Please include a cover letter explaining why this manuscript is suitable for publication in *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Why will your research paper inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

If your study addresses an infection that is outside our detailed scope, you must first send a pre-submission inquiry indicating why you consider the infection to be a neglected tropical disease.

Electronic Formats

Our submission system supports a limited range of formats for text and graphics. The following file formats/types and manuscript information are required before submission. If you are concerned about the suitability of your files, please contact us at [plosntds \[at\] plos.org](mailto:plosntds[at]plos.org).

Manuscript and Table Files

Articles can be submitted for review in DOC, DOCX, RTF, or PDF. Any articles that have been prepared in LaTeX will be accepted for review, but only in PDF format. After acceptance, only text files (RTF or DOC) of the revised manuscript and tables can be accepted for use in the production process.

Math Equations and DOCX

If your manuscript is or will be in DOCX and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

If you have not yet composed your article, you can ensure that the equations in your DOCX file remain editable in DOC by enabling “Compatibility Mode” before you begin. To do this, open a new document and save as Word 97-2003 (*.doc). Several features of Word 2007/10 will now be inactive, including the built-in equation editing tool. You can insert equations in one of the two ways listed below.

If you have already composed your article as DOCX and used its built-in equation editing tool, your equations will become images when the file is saved down to DOC. To resolve this problem, re-key your equations in one of the two following ways.

1. Use MathType to create the equation. MathType is the recommended method for creating equations.
2. Go to Insert > Object > Microsoft Equation 3.0 and create the equation.

If, when saving your final document, you see a message saying “Equations will be converted to images,” your equations are no longer editable and PLOS will not be able to accept your file.

LaTeX

Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files and formatting information will be required as a zipped file. Please consult our [LaTeX Guidelines](#) for a list of what will be required.

Tables

Tables must conform to our [Guidelines for Figure and Table Preparation](#) and placed at the end of the article DOC or RTF file. Accepted LaTeX submissions only should have table files—which must also conform to these guidelines—uploaded individually into the online submission system.

Figure Files

Graphics files can only be submitted in EPS or TIF format. For the article to be accepted for publication, the author will need to supply high-resolution versions of the figures. When preparing your figures, please ensure that the files conform to our [Guidelines for Table and Figure Preparation](#).

If you are uploading your files in EPS format, please use the "create outlines" option under the type menu in Illustrator so that all text and fonts appear as intended in print. If you need additional help with figure preparation, please contact [figures \[at\] plos.org](mailto:figures@plos.org).

Authors are encouraged to provide a striking image to accompany their article, if one is available. This image may be chosen to highlight the article on our journal Web site.

PLOS does not accept vector EPS figures generated using LaTeX. We only accept LaTeX generated figures in TIFF format. Export your LaTeX files as PDFs, and then open them in GIMP or Photoshop and save as TIFF. In general, Figures must be generated in a standalone graphics application such as Adobe Illustrator, InkScape, PyMol, MatLab, SAS, etc. Please see our [Figure Guidelines](#) for more information.

PLOS applies the Creative Commons Attribution (CC BY) license to all figures we publish, which allows them to be freely used, distributed, and built upon as long as proper attribution is given. Please do not submit any figures that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CC BY license.

Financial Disclosure

This section should describe sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's Web site. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the aforementioned sentence as needed.

Competing Interests

The submitting author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the paper. The information entered here will appear in the published version, so please do not include the same in the manuscript file.

Reviewers are also asked to declare any interests that might interfere with their objective assessment of a manuscript. Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles. Read more about PLOS's [Competing Interests Policy](#).

Abbreviations

Please keep abbreviations to a minimum and define them upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature. We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

- We strongly encourage the use of **SI units**. If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value.
- Species names should be italicized (e.g., *Homo sapiens*) and the full genus and species must be written out in full, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper; after that, the first letter of the genus name, followed by the full species name may be used.
- Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., **HUGO** for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman: v-fes, c-MYC, etc.
- The Recommended International Non-Proprietary Name (rINN) of drugs should be provided.

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources. Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate). Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

- ArrayExpress
- BioModels Database
- Database of Interacting Proteins
- DNA Data Bank of Japan [DDBJ]
- DRYAD
- EMBL Nucleotide Sequence Database
- GenBank

- Gene Expression Omnibus [GEO]
- Protein Data Bank
- UniProtKB/Swiss-Prot
- ClinicalTrials.gov

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- Ensembl
- Entrez Gene
- FlyBase
- InterPro
- Mouse Genome Database (MGD)
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)
- PubChem

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Organization of the Manuscript

Most articles published in *PLOS Neglected Tropical Diseases* are organized into the following sections: Title, Authors and Affiliations, Abstract, Author Summary, Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Figure Legends, and Tables. Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section. All manuscripts must contain line numbers. Although we have no firm length restrictions for the entire manuscript, we urge authors to present and discuss their findings concisely.

Title (150 characters)

The title should be specific to the study yet concise, and should allow sensitive and specific electronic retrieval of the article. It should be comprehensible to readers outside your field. Avoid specialist abbreviations if possible. Titles should be presented in title case, meaning that all words except for prepositions, articles, and conjunctions should be capitalized. If the paper is a randomized controlled trial or a meta-analysis, this description should be in the title.

Examples:

- Climate Change and Spread of Lymphatic Filariasis in Sub-Saharan Africa
 - A Cluster-Randomized Controlled Trial of a Nurse-Led Deworming Program for Soil-Transmitted Helminths
- Please also provide a brief Short Title of no more than 50 characters (including spaces).

Authors and Affiliations

Provide the first names or initials (if used), middle names or initials (if used), surnames, and affiliations—department, university or organization, city, state/province (if applicable), and country—for all authors. One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the summary of the author contributions to the study are accurate and complete. If the article

has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

(For authorship criteria, see Supporting Information and Materials Required at Submission)

Abstract

The abstract succinctly introduces the paper. We advise that it should not exceed 250 – 300 words. It should mention the techniques used without going into methodological detail and summarize the most important results with important numerical results given. The abstract is conceptually divided into the following three sections with these headings: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance. Please do not include any citations in the abstract. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150- to 200-word non-technical summary of the work, immediately following the Abstract. Subject to editorial review and author revision, this short text is published with all research articles as a highlighted text box.

Distinct from the scientific abstract, the author summary should highlight where the work fits in a broader context of life science knowledge and why these findings are important to an audience that includes both scientists and non-scientists. Ideally aimed to a level of understanding of an undergraduate student, the significance of the work should be presented simply, objectively, and without exaggeration.

Authors should avoid the use of acronyms and complex scientific terms and write the author summary using the first-person voice. Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure that they effectively communicate their findings to a general audience.

Examples are available at:

Pseudogenization of a Sweet-Receptor Gene Accounts for Cats' Indifference toward Sugar

A Hybrid Photoreceptor Expressing Both Rod and Cone Genes in a Mouse Model of Enhanced S-Cone Syndrome

Life in Hot Carbon Monoxide: The Complete Genome Sequence of *Carboxythermus hydrogenoformans* Z-2901

Introduction

The introduction should discuss the purpose of the study in the broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Methods

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. Detailed methodology or supporting information relevant to the methodology can be published on our Web site.

This section should also include a section with descriptions of any statistical methods employed. These should conform to the criteria outlined by the Uniform Requirements, as follows: "Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible,

quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, which fails to convey important quantitative information. Discuss the eligibility of research participants. Give details about randomization. Describe the methods for and success of any blinding of observations. Report complications of treatment. Give numbers of observations. Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial). References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated) rather than to papers in which the designs or methods were originally reported. Specify any general-use computer programs used."

Results

The results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supporting files; these are published online alongside the accepted article. The results section should be written in past tense.

As outlined in the Uniform requirements, authors that present statistical data in the Results section, should "...specify the statistical methods used to analyze them. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as "random" (which implies a randomizing device), "normal," "significant," "correlations," and "sample." Define statistical terms, abbreviations, and most symbols."

Discussion

The discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalisability, clinical relevance, strengths, and, most importantly, the limitations of your study. You may wish to discuss the following points also. How do the conclusions affect the existing knowledge in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done?

Acknowledgments

People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. You must also ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Details of the funding sources that have supported the work should be confined to the funding statement provided in the online submission system. Do not include them in the acknowledgments.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only as "unpublished data." All "personal communications" citations should be supported by a letter from the relevant authors.

Style information:

- PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first five authors, et al.
- References are listed and numbered in the order that they appear in the text.
- In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets.
- The parts of the manuscript should be in the correct order *before* ordering the citations: body, boxes, figure captions, tables, and supporting information captions.

- Abstracts and author summaries may not contain citations.
- Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For convenience, a number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., Reference Manager, EndNote).

Published Papers

1. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Genet Mol Res 10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

Accepted, unpublished papers

Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.

Electronic Journal Articles

1. Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. Global Health 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.

Books

1. Bates B (1992) Bargaining for life: A social history of tuberculosis. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.

Book Chapters

1. Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. AIDS and the historian. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.

Figure Legends

The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without switching back and forth between this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words that can stand alone, without the use of figure part labels. The overall legend itself should be succinct, while still explaining all figure parts, symbols, and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.

Tables

All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables should not occupy more than one printed page; larger tables can be published as online supporting information. Tables must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables. Please ensure that the files conform to our Guidelines for Figure and Table Preparation when preparing your tables for production.

Tables should be placed at the end of the manuscript file, rather than uploaded separately into the submission system.

Multimedia Files and Supporting Information

We encourage authors to submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting material will be subject to peer review, and should be smaller than 10 MB in size because of the difficulties that some users will experience in loading or downloading files of a greater size.

Supporting files should fall into one of the following categories: Dataset, Figure, Table, Text, Protocol, Audio, or Video. All supporting information should be referred to in the manuscript with a leading capital S (e.g., Figure S4 for the fourth supporting information figure). The numbered title and caption for each supporting information file should be included in the main article file, after the titles and captions for the main figures.

Supporting files may be submitted in a variety of formats, but should be publication-ready, as these files are not copyedited. Carefully consider whether your supporting information needs to be searchable and/or editable, and choose the most suitable format accordingly. See the [Supporting Information Guidelines](#) for more details about our requirements for supporting information and multimedia files.