Sara Macente Boni

Avaliação de método diagnóstico não invasivo para leishmaniose tegumentar americana através da reação em cadeia da polimerase

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. José Angelo Lauletta
Lindoso

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Boni, Sara Macente

Avaliação de método diagnóstico não invasivo para leishmaniose tegumentar americana através da reação em cadeia da polimerase / Sara Macente Boni. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Diagnóstico 3.Mucosa nasal
4.Reação em cadeia da polimerase 5.DNA de cinetoplasto 6.Proteínas de choque térmico HSP70

USP/FM/DBD-254/16

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese especialmente

À minha mãe, Vera, que muitas vezes se doou e renunciou aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao amor, apoio e dedicação que você sempre teve por mim.

Ao meu marido, Marcelo, que esteve ao meu lado durante todos estes anos me apoiando e incentivando para a realização dos meus sonhos. Agradeço pela paciência e compreensão com minha ausência durante essa longa jornada.

Aos meus irmãos, Yris e Tiago, pelo
companheirismo, amor e amizade.

À minha querida “Vó Antônia” pela
sabedoria, amor e carinho que sempre teve
comigo.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos científicos, pela amizade e confiança, e a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, ajudando a me desenvolver como profissional.

Obrigada pela amizade e confiança que sempre demonstrou ter por mim.

AGRADECIMENTOS

A conclusão do doutorado representa uma etapa realizada do meu sonho. O aprendizado da pesquisa aplicada a clínica, o convívio com pacientes, alunos, colegas de trabalho e professores, tudo isso representa o lugar onde eu queria estar.

A todos meus agradecimentos

À Deus, Dono soberano da minha existência, por guiar minha vida, concedendo-me saúde e perseverança nesta grande jornada.

Aos pacientes que contribuíram com nosso estudo na esperança de melhores cuidados.

À Dr^a Rita de Cássia Soler e a Dr^a Luiza Keiko Oyafuso pela ajuda na obtenção das amostras clínicas.

À chefia do laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia, Dra. Kelly Kanunfre, pelo acolhimento e por disponibilizar a estrutura do laboratório para este estudo.

Às professoras Dra. Hiro Goto e Dra Thelma Okay, por abrir seu laboratório para a execução dos experimentos.

À Elizabete Ourique pela colaboração com o estudo, pela amizade e carinho demonstrados durante estes 4 anos.

Aos alunos, ex-alunos e funcionários do laboratório meus sinceros agradecimentos pela amizade e ajuda, principalmente nos momentos em que eu estava longe da minha família (Amanda, Ana Paula, Daiane, Ive, Mariane, Mirella, Renata, Dr^a Sandra e Thaís).

À Unicesumar, que nas pessoas do prof^o Wilson de Mattos, prof^o Wilson Filho, prof^a Ludhiana, prof^o Valdecir Simão e prof^a Solange Lopes, me apoiaram e possibilitaram a realização deste sonho.

Aos grandes amigos da coordenação da saúde da Unicesumar, em especial Sidney Edson Mella Júnior, que me incentivaram e me substituíram em minha ausência para realização dos experimentos.

Muito obrigada ao instituto de Medicina Tropical de São Paulo, ao Instituto de Infectologia Emílio Ribas e ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

A todos que fizeram parte de alguma forma deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o
que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor do momento da sua publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3. Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	24
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Materiais	27
4.1.1 Sujeitos de pesquisa	27
4.1.2 Amostras biológicas	27
4.2 Métodos	28
4.2.2 Sorologia para <i>Leishmania</i>	29
4.2.3 Reação de Montenegro	29
4.2.4 Extração de DNA provenientes de swab citológico	29
4.2.5 Verificação da qualidade das amostras de DNA obtidas	30
4.2.6 PCR para controle da extração de DNA	31
4.2.9 Análise dos produtos de PCR	33
4.2.10 Controle dos ensaios	33
4.3 Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Sujeitos de pesquisa e verificação da qualidade das amostras de dna obtidas	36
5.2 PCR para controle da extração de DNA	37
5.3 Resultado dos pacientes com doença ativa e comparação dos métodos tradicionais	38
5.4 Resultados dos pacientes já tratados	48

5.5 Resultados dos pacientes com mucosa nasal íntegra e com diagnóstico atual ou previo de leishmaniose cutanea localizada ou leishmaniose mucosa.	51
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	65
8. REFERÊNCIAS	68

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Célsius
(V.)	Subgênero <i>Viannia</i>
(L.)	Subgênero <i>Leishmania</i>
Abs	Absorbância
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ELISA	Enzyme Linked Immunossorbent Assay
g	Giros
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Hsp70	Proteína de Choque Térmico 70Kda
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN	Interferon
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
IL	Interleucinas
ITS	Internal Transcribed Spacers
kDNA	Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto de tripanosomatídeos
L.	Gênero <i>Leishmania</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
Lu.	Gênero <i>Lutzomyia</i>

LV	Leishmaniose visceral
MgCl₂	Cloreto de magnésio
µg	Micrograma
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Neg	Negativo
ng	Nanograma
NR	Não realizado
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar
Pos	Positivo
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
RM	Reação de Montenegro
RNA	Ácido ribonucleico
spp.	Espécies
Sug	Sugestivo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Th	Células T auxiliares
TNF	Fator de Necrose Tumoral
ui	Unidade Internacional

FIGURAS

Figura 1:	Forma amastigota da <i>Leishmania</i> . Fonte: Brasil, 2010	3
Figura 2:	Forma promastigota da <i>Leishmania</i> . Fonte: Brasil, 2010	3
Figura 3:	Incidência de leishmaniose tegumentar americana por 100.000 habitantes, por município, nas américas, 2013. Fonte: OPAS/OMS, 2015	4
Figura 4:	Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005. Fonte: Brasil, 2010	5
Figura 5:	LTA. (A) Forma cutânea (lesão clássica em moldura); (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa; (D) Forma disseminada. Fonte: Gontijo e Carvalho, 2003.....	8
Figura 6:	Ensaio de PCR para detecção do gene beta-globina com primers <i>hβg-f</i> e <i>hβg-r</i> . Figura de revelação em gel agarose a 2%. Amostra 1 ladder de 100pb; amostras 2 a 9 amostras clínicas, amostra 10 controle positivo e amostra 11 controle negativo.	38
Figura 7:	Ensaio de pcr para detecção do kDNA com primers <i>kDNA 20</i> e <i>kDNA 22</i> . Figura de revelação em gel agarose a 2%. Amostra 1 ladder; amostras 2 a 5 representando amplificação das amostras clínicas positivas para kdna, amostra 6 controle positivo e amostra 7 controle negativo.	41
Figura 8:	Ensaio de clivagem com enzima de restrição <i>HaeIII</i> . Figura de revelação em gel de poliacrilamida a 10%. Amostra 1 e 11 ladder de 50pb; amostras 2 a 8 representando clivagem dos fragmento de amplificação para kDNA de amostras clínicas, amostras 9 e 10 controle positivo (<i>L. braziliensis</i> e <i>L. amazonenses</i> , respectivamente).....	42
Figura 9:	Ensaio de pcr para detecção do Hsp70 com primers <i>F1e</i> e <i>R1e</i> . Figura de revelação em gel agarose a 1,5%. Amostra 1 e 10 ladder; amostras 2 controle positivo, amostras 3 a 8 representando a não amplificação das amostras clínicas positivas para kDNA e amostra 9 controle negativo.....	43

TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos pacientes quanto ao tipo de leishmaniose e decurso da doença.....	36
Tabela 2: Dados referentes a quantificação média de DNA recuperado a partir de coleta de amostras clínicas com swab citológico e do grau de pureza do DNA relacionados com amostras clínicas provenientes de pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea, suspeita de leishmaniose mucosa e pacientes pós-tratamento.....	37
Tabela 3: Resultados de exames de rotina de 11 pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.....	39
Tabela 4: Resultados de exames de rotina de 19 pacientes com diagnóstico de leishmaniose mucosa atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.....	39
Tabela 5: Análise da comparação de testes diagnósticos da avaliação de 33 amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.....	41
Tabela 6: Análise da comparação de testes diagnósticos com diferentes alvos de PCR na avaliação de 33 amostras coletadas através de swab de pacientes com suspeita de leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.....	44
Tabela 7: Análise da comparação de testes diagnósticos com alvo Hsp70 na avaliação de 23 amostras coletadas através de biópsia e de 33 amostras de swab de pacientes com suspeita de leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.....	45
Tabela 8: Análise da comparação de testes diagnósticos com mesmo alvos em PCR convencional e qPCR na avaliação de 33 amostras coletadas através de swab de pacientes com suspeita de leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.....	46
Tabela 9: Índice de concordância de PCR-kDNA, PCR-Hsp70 e qPCR de swab com testes convencionais para amostras de LC e LM de pacientes com suspeita de leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.....	48

Tabela 10: Distribuição de pacientes com diagnóstico prévio de LM já tratados, relacionado com o resultado da pcr-kdna e PCR-Hsp70 atendidos no ambulatório de leishmanioses do IIER de são paulo no período de agosto de 2013 a julho de 2015.	50
---	----

Tabela 11: Características clínica e resultados de exames laboratoriais de biologia molecular da mucosa nasal íntegra de pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea e mucosa ativa e já tratados para esta enfermidade atendidos no IIER entre agosto de 2013 a julho de 2015.	52
--	----

RESUMO

Boni SM. *Avaliação de método diagnóstico não invasivo para leishmaniose tegumentar americana através da reação em cadeia da polimerase* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: O diagnóstico etiológico da leishmaniose tegumentar baseia-se na detecção do parasito em amostras de lesão colhida por método invasivo. A detecção de DNA do parasito, através da PCR, poderia ser uma alternativa mais sensível, porém não está disponível na rotina diagnóstica e foi padronizada em amostras clínicas colhidas por métodos invasivos, tais como raspado, aspirado ou biópsia da lesão. Uma proposta para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar seria a obtenção de material de lesão (mucosa ou cutânea) através de métodos de coleta menos invasivos e que fosse possível detectar DNA do parasito a partir de pequenas quantidades de amostra clínica. Neste trabalho avaliamos a eficácia da PCR, em amostras colhidas por método não invasivo (swab de lesão) como ferramenta para ser utilizada no diagnóstico de leishmaniose (mucosa e cutânea localizada), bem como para detecção precoce de *Leishmania* em mucosa de pacientes com lesão cutânea ativa e como ferramenta de avaliação de resposta terapêutica na leishmaniose mucosa. **Metodologia:** Entre os meses de agosto de 2013 a julho de 2015 foram selecionados 57 pacientes no ambulatório de Leishmanioses do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, dos quais foram coletadas amostras de lesão cutânea ou mucosa através de swab e de biópsia das lesões. Em paralelo, foi realizada rotina laboratorial para diagnóstico de leishmaniose nos pacientes que apresentavam lesão ativa (anatomopatológico, pesquisa e cultura de *Leishmania*, sorologia e teste de Montenegro). As amostras colhidas por

biópsia ou swab foram avaliadas através da reação em cadeia da polimerase tendo como alvos o minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* para PCR convencional e o gene da proteína de choque térmico 70Kda (*Hsp70*) para PCR convencional e PCR em tempo real. **Resultados:** A detecção de DNA de *Leishmania* em amostras colhidas por swab de lesões ativas foi semelhante as das amostras colhidas por biópsia das mesmas lesões. Quando comparado aos métodos comumente empregados no diagnóstico da leishmaniose tegumentar, a PCR em material colhido por swab apresentou desempenho superior. Foi demonstrado que utilizando os iniciadores para o alvo kDNA obtivemos maior eficácia quando comparado com o alvo Hsp70, seja pela PCR convencional como pela PCR em tempo real (sensibilidade de 94.1%, 42.4% e 39.4%, respectivamente). Ao analisarmos amostras de pacientes já tratados para leishmaniose mucosa observamos positividade de 86% para kDNA e de 22% para Hsp70. Nas amostras de mucosa nasal íntegra e com leishmaniose cutânea ativa, coletadas com swab para detecção precoce da doença, obteve-se 92.9% de positividade com kDNA e 28.6% com Hsp70. **Conclusões:** Os resultados obtidos sugerem que o método de coleta de amostra biológica através do swab para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar apresenta eficácia comparada com o método de coleta por biópsia. A detecção de DNA em amostras colhidas por swab permite analisar a presença de DNA do parasito em tecido sem lesão, podendo detectar a presença de *Leishmania* mesmo antes de alterações clínicas estarem presentes. A monitorização da resposta terapêutica da leishmaniose mucosa pode ser feita através da detecção de DNA de *Leishmania* em amostras colhidas por swab.

Descritores: Leishmaniose; Diagnóstico; Mucosa Nasal; Reação em cadeia da polimerase; DNA de Cinetoplasto; proteínas de choque térmico Hsp70.

SUMMARY

Boni SM. *Non-invasive diagnostic method of evaluation for American tegumentar leishmaniasis by polymerase chain reaction* [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016

Introduction: Etiologic diagnosis of tegumentary leishmaniasis is based on the detection of the parasite in injury samples collected by invasive method. DNA detection of the parasite by PCR, could be a more sensible alternative, but is not available in routine practice and it was standardized in clinical samples by invasive methods such as scrapes, aspirate or biopsy of the lesion. A proposal for the diagnosis of tegumentary leishmaniasis lesions would obtaining material (cutaneous or mucosal) through less invasive collection methods, and it was possible to detect parasite DNA from small quantities of clinical specimen. In this study we evaluate the effectiveness of the PCR in samples collected by non-invasive method (swab injury) as a tool to be used in the diagnosis of leishmaniasis (mucosal and localized cutaneous), as well as for early detection of *Leishmania* in mucosa from patients with cutaneous lesions active and as an evaluation tool of therapeutic response in mucosal leishmaniasis.

Methodology: Between August 2013 to July 2015 were selected 57 patients from the Leishmaniasis out clinic from the Institute of Infectious Diseases Emilio Ribas, which samples of cutaneous lesion or mucosa were collected by swab and biopsy of the lesions. In parallel, routine laboratory was carried out for the diagnosis of leishmaniasis in patients with active lesions (histopathology, search and *Leishmania* culture, serology and Montenegro skin test antigen). The samples taken by biopsy or swab were assessed by polymerase chain reaction having as targets the minicircle kinetoplast DNA

(kDNA) of *Leishmania* for conventional PCR and gene heat shock protein 70kDa (Hsp70) for conventional PCR and real-time PCR. **Results:** *Leishmania* DNA detection in samples taken by swab of active lesions was similar to the samples taken by biopsy from the same lesion. When compared to the methods commonly used in the diagnosis of tegumentary leishmaniasis, PCR material collected by swab showed superior performance. It was shown that using the primers for the target kDNA obtained more effectively compared with the target Hsp70, or by conventional PCR and by real-time PCR (sensitivity 94.1%, 42.4% and 39.4%, respectively). When analyzing samples from patients already treated for mucosal leishmaniasis observed positivity of 86% to kDNA and 22% for Hsp70. Samples of nasal mucosa and active cutaneous leishmaniasis, collected by swab for early detection of disease, it obtained 92.9% positivity with kDNA and 28.6% with Hsp70. **Conclusions:** Our results suggest that the biological sample collection method using the swab for the molecular diagnosis of tegumentary leishmaniasis had compared efficacy with biopsy collection method. The DNA detection collected by swab samples allows to analyze the presence of DNA of the parasite in tissue without damage and can detect the presence of *Leishmania* even before clinical changes are present. The monitoring of therapeutic response mucosal leishmaniasis can be made by *Leishmania* DNA detection in samples per swab.

Descriptors: leishmaniasis; cutaneous; diagnosis; nasal mucosa; polymerase chain reaction; DNA, kinetoplast; HSP70 heat-shock proteins.

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças não contagiosas de ocorrência mundial, que compreendem um conjunto de manifestações clínicas de amplo espectro, caracterizando-se como um grave problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais. Existem duas formas principais da doença: a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT) (Ross 1903; OMS, 2010), esta última, objeto de nosso estudo.

A LT é causada por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, transmitida por dípteros dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, no Velho Mundo e Novo Mundo, respectivamente. (Condino *et al*, 2008; Rey, 2001; Myler e Fasel, 2008). Durante seu ciclo biológico, a *Leishmania* apresenta duas formas: amastigota (Figura 1) que é parasito obrigatório intracelular em vertebrados multiplicando-se em macrófagos, apresenta formato oval, flagelo curto e interiorizado, núcleo arredondado e excêntrico e cinetoplasto anterior ao núcleo; e promastigota (Figura 2) que se desenvolve no tubo digestório dos vetores invertebrados e apresenta formato alongado, flagelo longo na extremidade anterior, núcleo no terço médio e cinetoplasto na posição anterior ao núcleo (Lessa, 2007; Grimaldi e Tesh, 1993; Rey, 2008). A transmissão ocorre quando fêmeas do flebotomíneo infectadas realizam repasto sanguíneo inoculando o parasito na forma promastigota (Gontijo e Carvalho, 2003).

Figura 1: Forma amastigota da *Leishmania*. Fonte: Brasil, 2010

Figura 2: Forma promastigota da *Leishmania*. Fonte: Brasil, 2010

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 12 milhões de pessoas em 98 países e 3 territórios nos cinco continentes estão infectadas com *Leishmania* e cerca de 350 milhões correm o risco de contrair a infecção. A incidência anual é estimada em 0,7-1,2 milhões de casos de LT e 400 mil casos da forma visceral e dez países, incluindo o Brasil, representam 70 a 75% da estimativa global de leishmaniose tegumentar (LT) (Alvar et al., 2012; OMS, 2016). Segundo estimativas da OMS, apesar das leishmanioses ocorrerem em 98 países, sua notificação é compulsória em apenas 34% deles (OMS, 2015). Nas Américas, a LTA está presente em 18 países com ocorrência média anual de 57.228 casos. Em 2013, foram notificados 47.492 casos distribuídos em 16 países americanos sendo que 78,8% dos casos (37.402 casos) ocorrem no Brasil e países da sub-região andina (OPAS/OMS, 2015) (Figura 3).

Figura 3: Incidência de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100.000 habitantes, por município, nas Américas, 2013. Fonte: OPAS/OMS, 2015

No período de 1990 a 2014, foram notificados 659.042 casos de LTA no Brasil. 20.296 desses casos ocorreram em 2014, sendo 51,18% na região Norte, 24,48% na região Nordeste, 7,19% na região Sudeste, 1,84% na região Sul, 14,97% na região Centro-oeste do Brasil e 0,34% dos casos foram de origem ignorada (Brasil, 2016).

No Brasil, foram identificadas sete espécies de *Leishmania* pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, causadoras de LTA, são estas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Gontijo e Carvalho, 2003; Guerra et al, 2011; Barral e Costa, 2011). A distribuição das espécies de *Leishmania* em diferentes regiões do país em 2005 está apresentada na figura 4. No Brasil, as principais espécies de vetores envolvidas na LTA são:

Lutzomyia flaviscutellata, *Lu. umbratilis*, *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. migonei*. (Rangel e Lainson, 2009), relacionadas com a transmissão de *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* e os demais com *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, respectivamente (Ready, 2013).

Figura 4: Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 2005. Fonte: Brasil, 2010

Existem três perfis epidemiológicos distintos da transmissão de LTA no Brasil: a transmissão silvestre, onde ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária (zoonose de animais silvestres); a transmissão ocupacional ou lazer, em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, ecoturismo; (antropozoonose); e a transmissão rural ou periurbana, em áreas de colonização (zoonose de matas residuais) ou periurbana, em que houve

adaptação do vetor ao peridomicílio (zoonose de matas residuais e/ou antroponose) (Marzochi, 1992).

A leishmaniose é considerada uma das cinco doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância mundial (Guerra *et al*, 2007). Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também pela possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo (Gontijo e Carvalho, 2003).

A LT pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, do tamanho e do local do inóculo e da situação nutricional e imunológica do hospedeiro (Lainson e Shaw, 1998; Beenal *et al*, 2003; Courret *et al*, 2003; Ghosn e Kurban, 2008). As lesões cutâneas causadas por *Leishmania* spp. podem se apresentar de quatro formas: localizada, disseminada, difusa e a recidiva cútis. Há ainda a forma cutânea atípica causada pela *Leishmania infantum* e que ocorre somente na América central (Honduras e Nicarágua) e a leishmaniose dérmica pós-kalazar (PKDL) causada pela *Leishmania donovani* e que ocorre principalmente na Índia e Sudão. Encontra-se também a forma mucosa, de natureza metastática na qual pode ocorrer a destruição do septo nasal e comprometimento de cavidade oral, resultando em deformidades severas (Figura 5.) (Rey, 2001; Gontijo e Carvalho, 2003; Reithinger *et al*, 2007; Goto e Lindoso, 2010).

A forma cutânea localizada é caracterizada por lesões ulceradas, indolores, únicas ou múltiplas (até 10 lesões), que se desenvolvem no local da picada do vetor, em regiões expostas como orelhas, face, membro superior

entre outros (Gontijo e Carvalho, 2003) e é causada por várias espécies do parasito, tanto do subgênero *Leishmania* como *Viannia*, e suas prevalências variam de acordo com as regiões da América (Gramiccia E Gradoni, 2005; OMS, 2010).

A leishmaniose cutânea (LC) disseminada apresenta-se como doença rara, sendo observada em até 2 % dos casos (Costa, 2011), que se caracteriza pela presença de numerosos nódulos ou lesões ulceradas (de 20 até centenas) e tem sido descrita em associação com infecções por *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (OMS, 2010). Neste caso, o parasito se dissemina por via hemática ou linfática, causando lesões distantes do local da picada (Araújo, 2013). A observação da leishmaniose cutânea difusa é ainda mais rara, sendo causada, no Brasil, pela *L. amazonensis* (Gontijo e Carvalho, 2003). Tipicamente, não há lesões nas mucosas, a infecção é caracterizada por uma lesão primária, que se espalha lentamente para envolver várias áreas da pele (rosto, orelhas, extremidades, nádegas) até que todo o corpo seja afetado. Placas e nódulos podem se formar por todo o corpo, assemelhando-se a Hanseníase virchowiana. Embora as lesões não sejam destrutivas nem erosivas, elas são desfigurantes (Costa *et al*, 1998).

A forma recidiva cútis da doença, ou metaleishmaniose, aparece no mesmo local ou nas bordas da lesão da LC anteriormente curada, geralmente, no prazo de dois anos (Calvopina *et al*, 2006). Muitos especialistas consideram esta manifestação da leishmaniose uma sequela da LC, sua característica crônica e a resistência ao tratamento causam grande preocupação (Modabber *et al*, 2007). Geralmente a leishmaniose mucosa (LM) surge após a cura clínica da LC, com início insidioso e pouca sintomatologia, afeta o nariz, boca,

garganta e faringe, com destruição dos tecidos cartilagosos e desfigurações no rosto (Gontijo e Carvalho, 2003; Passi *et al*, 2014). Na maioria dos casos, a LM resulta de LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (Silveira *et al*, 1999; Brasil, 2007). No Brasil, cerca de 3 a 8% dos casos de LC podem evoluir para a LM (Carvalho *et al*, 2006).

Figura 5: LTA. (A) Forma cutânea (lesão clássica em moldura); (B) Forma mucosa; (C) Forma difusa; (D) Forma disseminada. Fonte: Gontijo e Carvalho, 2003.

Os mecanismos da resposta imune na LTA ainda não estão totalmente esclarecidos, porém sabe-se que o controle da infecção está relacionado com a mediação da resposta imune inata e adquirida, através da geração de células T auxiliares pelo hospedeiro, que são capazes de ativar macrófagos através de citocinas, sendo mais frequentes em lesões crônicas (Sjölander *et al*, 1998; OMS, 2010). Na LC experimental, as células TCD4+ que produzem principalmente interleucina-2 (IL-2), Interferon gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (resposta T helper 1 - Th1), estão relacionadas à

resistência ao patógeno e cura espontânea da lesão, e a resposta TH2 caracterizada pela produção de IL-4 e IL-5 por células TCD4+ está associada à susceptibilidade à infecção e proliferação do parasita (Heinzel *et al*, 1991; Launois *et al*, 1997; Sacks e Noben-Trauth, 2002).

A interação da *Leishmania* e da resposta do hospedeiro é fundamental, não apenas em termos da evolução clínica ou sub-clínica de infecção, mas também da taxa de cura espontânea e doença recorrente. Os neutrófilos são as primeiras células a combater o parasito no local de sua inoculação e as células do sistema imune inato, incluindo células natural killers, podem influenciar o curso da infecção e a doença (Laskay *et al*, 1995; OMS, 2010). A resposta dos anticorpos ocorre durante a fase ativa da infecção, em níveis baixos que tendem a diminuir alguns meses após o fim do tratamento. (Delgado *et al*, 1996; Amato *et al*, 1998).

Segundo Carvalho *et al* (2005), o excesso ou a deficiência da resposta imunológica pode levar a cronificação da doença, que se torna uma situação desafiadora no quesito terapêutico (Goto e Lindoso, 2010). Na LC e na LM, existe uma forte resposta Th1, o que controla a multiplicação do parasita, porém há lesão tecidual (Ribeiro-de-Jesus *et al*, 1998). Enquanto que, na leishmaniose disseminada e na LC difusa, a diminuição ou ausência de resposta Th1 favorece a multiplicação e disseminação da *Leishmania* (Bomfim *et al*, 1996; Turetz *et al*, 2002).

As células TCD4+, principalmente, e TCD8+ secretoras de IFN- γ e TNF- α constituem a maioria do infiltrado celular das lesões cutâneas localizadas (Bacellar *et al*, 2002). IL-10 e IL-13 têm sido associados a doenças crônicas e IL-10, produzida principalmente células reguladoras TCD4+CD25, tem

sido relatada na presença do parasito, mesmo após a cura da lesão causada por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (Belkaid, 2003; OMS, 2010). A razão pela qual, apesar de haver uma forte resposta Th1, mas não existir uma completa destruição de parasitas, não é completamente entendida (Carvalho *et al*, 2005).

Na LC disseminada, há produção de IFN- γ e TNF- α , porém em baixas concentrações quando comparada às encontradas na LC localizada, o que resulta em frequentes lesões mucosas. A diminuição de resposta Th1 em pacientes com leishmaniose disseminada favorece a multiplicação e predispõe à disseminação da doença (Turetz *et al*, 2002). Já na LC difusa é relatado ausência de mediação de células imunes e as respostas imunológicas mediadas por células contra antígenos de *Leishmania in vitro* são baixas ou ausentes, enquanto as respostas a antígenos não relacionados ou ativadores policlonais são normais (Barral-Neto *et al*, 1998; Carvalho *et al*, 2005; OMS, 2010). A avaliação da expressão de RNA mensageiro para citocinas demonstrou que células mononucleares de pacientes com LC difusa expressam grandes quantidades de IL-10 e IL-4 e baixas quantidades de IFN- γ durante a fase ativa da doença (Bomfim *et al*, 1996).

Células TCD4 e TCD8 secretoras de IFN- γ são abundantes na lesão mucosa. A menor expressão de receptor de IL-10 e a presença de citocinas anti-inflamatórias quando comparado com a forma cutânea, pode contribuir para a resposta pró-inflamatória da doença (Silveira *et al*, 1999; Bacellar *et al*, 2002; OMS, 2010). A resposta fisiopatogênica de pacientes com LM se dá de forma hiperérgica-paucibacilar, ou seja, pelo exagero das respostas imunes celulares anti-*Leishmania* frente à escassez de parasitos (Bacellar *et al*, 2002). Isto remete a uma resposta terapêutica ineficaz, pois ainda que as lesões re-

gridam ou mesmo desapareçam com os tratamentos convencionais, as recidivas de LM são frequentes (Brasil, 2010). Polimorfismo de sequências promotoras de TNF- α tem sido associada com LM, e o inibidor da síntese de TNF- α , pentoxifilina, tem ação coadjuvante imunomoduladora em associação com medicamentos antimoniais no tratamento da mesma (OMS, 2010).

O tratamento da LTA é iniciado somente quando há a definição de caso após uma série de etapas de diagnóstico. No Brasil, o tratamento de todas as formas clínicas da LT baseia-se no uso de antimonial pentavalente, anfotericina B ou pentamidina (Goto e Lindoso, 2010). O antimonial pentavalente é a droga de escolha para o tratamento de leishmanioses desde 1945 (Lima *et al*, 2007), porém, em caso de gestantes e pacientes co-infectados com HIV, a anfotericina B é considerada a droga de primeira escolha (Amato *et al*, 2007). A crescente tendência de falha terapêutica já é documentada em diversos lugares (Croft *et al*, 2006), sendo que estudos realizados na América Latina têm relatado eficácia variável desta droga contra LC: 7% fracasso do tratamento na Bolívia (Bermudez *et al*, 2006), 16% no Brasil (Oliveira-Neto *et al*, 1997), e até 39% na Colômbia (Palacios *et al*, 2001). Informações sobre o papel desempenhado pelas diferentes espécies de *Leishmania* na resposta terapêutica da LTA ainda é escassa, porém foi demonstrada diferença de susceptibilidade das espécies do parasito frente terapia antimonial (Romero *et al*, 2001; Arevalo *et al*, 2007).

O critério de cura considerado pelo Ministério da Saúde é clínico e baseado na completa cicatrização das lesões com reepitelização do local, que deve acontecer até três meses depois do tratamento, no caso da LC. (Brasil, 2011b). Estudos indicam que não há cura parasitológica na LC, podendo o

parasito ser encontrado em pacientes curados clinicamente após vários anos (Schubach *et al*, 1998; Mendonça *et al*, 2004). O mesmo acontece com a LM, apesar da regressão de evidências clínica otorrinolaringológica de lesões de tecidos após tratamento, estudos demonstram a ausência de cura completa do infiltrado inflamatório, potencialmente explicando a frequência de LM recorrente (Franke *et al*, 1990). Os pacientes com LM são mais resistentes a terapias convencionais e os casos de recidivas tornam-se mais frequentes (Zajtchuk *et al*, 1989). É considerado recidiva o aparecimento de novas lesões, ou retorno de lesões tratadas, após, pelo menos, um ano do tratamento (Tuon *et al*, 2008).

A recorrência de LM é comum e os pacientes são constantemente submetidos a tratamento repetitivos (Amato *et al*., 2007). A falha clínica ocorre em 42% (Franke *et al*, 1990) e recaídas foram documentadas em até 19% dos pacientes após 3 a 10 anos de acompanhamento (Netto *et al*, 1990).

Um diagnóstico preciso e precoce da LTA é de extrema importância para o tratamento adequado e o controle das possíveis complicações e da cronificação da doença. Entretanto, ainda não se identificou um método “padrão-ouro” para o diagnóstico desta enfermidade (Manson-Barh, 1987; Reithinger *et al*, 2007; Rodríguez-Cortés *et al*, 2010; Souza *et al*, 2012). O diagnóstico da leishmaniose é estabelecido com base em informações epidemiológicas, apresentação clínica das lesões típicas e exames laboratoriais (Goto e Lindoso, 2010). Os exames laboratoriais podem ser feitos através de métodos parasitológicos (demonstração direta do parasito, isolamento em cultivo *in vitro*, isolamento *in vivo* e PCR) e imunológicos (testes intradérmicos e testes sorológicos) (Marzochi, 1992; Rodríguez-González *et al*, 2006; Brasil, 2007).

Apesar dos achados clínicos e da história epidemiológica poderem fortemente sugerir a possibilidade de leishmaniose, somente a identificação definitiva do parasita pode confirmar o diagnóstico. A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, a qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as formas clínicas e as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (Gontijo e Carvalho, 2003; Brasil, 2007; Carvalho, 2012).

Os métodos diagnósticos parasitológicos proporcionam o diagnóstico de certeza da doença, porém os testes atualmente utilizados apresentam baixa sensibilidade: a pesquisa direta para detecção de formas amastigotas em lesões de LC tem sensibilidade de apenas 60 a 65% (Singh, 2006), o exame histopatológico tem baixa sensibilidade devido à escassez de parasitos ou distorção de amastigotas ao fixar o tecido (Rodrigues, 2000) e a sensibilidade da cultura é em torno de 50% para *L. braziliensis* (OMS, 2010); além de desvantagens operacionais nas áreas endêmicas, pois o isolamento em cultura pode ser um processo lento e trabalhoso. (Weigle *et al*, 2002; Safaei *et al*, 2002).

O diagnóstico direto baseia-se na observação de amastigotas pela citologia em aspirado, esfregaços ou raspado de lesões ou ainda em fragmentos de lesão obtidos por biópsia e apresenta sensibilidade variável decorrente do tempo de evolução da lesão, das condições da amostra clínica e da qualificação do técnico responsável pela leitura da lâmina (Weigle *et al*, 2002; Gontijo e Carvalho, 2003). Nos casos produzidos por *L. braziliensis* a sensibilidade está em torno de 100% nos dois primeiros meses de evolução, 75% aos seis meses e 20% acima dos 12 meses (Furtado, 1980).

A observação de formas promastigotas, em culturas de tecidos com meios apropriados, apresenta variação de sensibilidade em decorrência das condições da coleta, da quantidade de material, da forma clínica e da espécie do parasito. A sensibilidade global do método está em torno de 50% para *L. braziliensis* (OMS, 2010). Esse procedimento exige facilidades laboratoriais, pessoal treinado e o tempo de leitura pode ser de até 28 dias, dessa forma o diagnóstico é um tanto demorado e nem sempre adequado para inquérito epidemiológico de larga escala (Ashford, 2000; Weigle *et al*, 2002; Gontijo e Carvalho, 2003).

O teste intradérmico (Teste de Montenegro) avalia a presença de hipersensibilidade tardia a antígenos de *Leishmania*. Apresenta alta sensibilidade e especificidade (Shaw e Lainson, 1975; Venazzi *et al*, 2007), porém resultados falsos negativos já foram descritos em pesquisa de infecção recente (Cuba-Cuba *et al*, 1985). Apesar de não discriminar doença atual de passada e de ser negativo na LC difusa e nos pacientes imunodeprimidos, possui grande valor presuntivo no diagnóstico da LTA, sendo útil em inquéritos epidemiológicos nas áreas endêmicas (Kar, 1995; Gontijo e Carvalho, 2003; Guarín *et al*, 2006). Apesar de ser um método decisivo para o diagnóstico de lesões antigas de *Leishmania* e de lesões nas mucosas, quando o número de parasitas é baixo e, portanto, difíceis de detectar (Costa *et al*, 1996), é frequente a observação de reatividade nas populações de áreas endêmicas, de tal forma que esta técnica não é útil no diagnóstico de lesão ativa (Araújo, 2013).

Anticorpos anti-leishmania estão presentes no soro de pacientes com LT e podem ser detectados por teste imunoenzimático (ELISA) ou imunofluorescência indireta (IFI), aglutinação e outros ensaios (Gontijo e Carvalho, 2003).

Dentre os testes sorológicos, a IFI é o mais utilizado. Esta técnica apresenta sensibilidade variável e existe a possibilidade de reações cruzadas, especialmente com o *Trypanosoma cruzi* que é prevalente em áreas endêmicas de LT, causando confusão em termos de diagnóstico (Kar, 1995). Os níveis de anticorpos detectáveis são mais elevados nos casos de LTA com múltiplas lesões (Menzel e Bienzel, 1978) e muito baixos nos casos de LTA localizada (Shaw e Lainson, 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).

O ELISA tem uma sensibilidade similar à IFI, entretanto é mais conveniente para estudos epidemiológicos (Hommel *et al*, 1978). Após o tratamento e cura, os títulos de anticorpos podem cair e desaparecer em alguns meses (Andrade *et al*, 2005). A existência de relatos de reação falso negativa em pacientes com LTA e reações positivas encontradas em pacientes com outras doenças (leishmaniose visceral, doença de Chagas, pênfigo foliáceo sul-americano, paracoccidiodomicose, esporotricose) e em indivíduos aparentemente saudáveis, levam ao questionamento do potencial valor das técnicas sorológicas em reconhecer casos de LTA em que não houve demonstração do parasito. (Vexenat *et al*, 1996; Silveira *et al*, 2006; Brasil, 2007; Ribeiro *et al*, 2007; Vega *et al*, 2013).

Nos últimos anos, as técnicas de diagnóstico molecular têm mostrado uma alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de LT (Reithinger e Dujardin, 2007). Apesar de diferentes técnicas moleculares terem sido avaliadas para o diagnóstico de LT, a reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui a principal técnica molecular utilizada, por apresentar vantagens como

a rapidez, sensibilidade e elevada especificidade, quando comparada às técnicas convencionais baseadas em pesquisa direta e cultura, além da identificação de espécies de *Leishmania* e a utilização a partir de diferentes iniciadores (Berrahal *et al*, 1996; Belli *et al*, 1998; Fisa *et al*, 2001; Lachaud *et al*, 2002; Singh, 2006; Reithinger e Dujardin, 2007; Satow *et al*, 2013).

Diversos genes alvos têm sido empregados para o diagnóstico gênero ou espécie-específico da LT, no entanto o mais utilizado é o DNA do cinetoplasto (kDNA) como alvo para a identificação e classificação de espécies de *Leishmania* (Das Gupta *et al*, 1991; Rodriguez *et al*, 1994). O kDNA é constituído de dois componente, os maxicírculos e os minicírculos, este último possui cerca de 10.000 cópias/célula, representando em torno de 95% do kDNA, sendo o alvo mais utilizado em diagnóstico molecular, enquanto o maxicírculo possui em torno de 30 a 50 cópias (Barker e Butcher, 1983; Stuart, 1983; Ray, 1987; Gramiccia *et al*, 1992; Rodrigues *et al*, 2002). Nos minicírculos, existe uma região que é conservada, enquanto que a região restante é considerada variável, sendo heterogênea mesmo entre cepas de uma mesma espécie (Fernandes *et al*, 1999) e isso permite a detecção de infecção por *Leishmania* com maior sensibilidade e especificidade (Rodrigues *et al*, 2002; De Oliveira *et al*, 2003; Tojal *et al*, 2006).

Outros genes, tais como *ITS*, *Hsp 70*, glicose 6 fosfato desidrogenase, subunidade 18S do RNA ribossomal ou a sequência mini-exon do RNA também tem sido empregados com sensibilidade e especificidade variáveis (Uliana *et al*, 1991; Uliana *et al*, 1994; Costa *et al*, 1996; Schonian *et al*, 1996, Belli *et al*, 1998; Delgado *et al*, 1998; Aviles *et al*, 1999; Pizzuto *et al*, 2001; Castilho *et al*, 2003; Garcia *et al*, 2004; Garcia *et al*, 2005; Garcia *et al*, 2007a;

Fraga *et al*, 2010; Goto e Lindoso, 2010; Montalvo *et al*, 2010). A utilização do gene que codifica a proteína de choque térmico de 70 kDa (*Hsp70*) como alvo da PCR e para a diferenciação de espécie vem sendo amplamente estudada (Garcia *et al*, 2004; Silva *et al*, 2010; Montalvo *et al*, 2010). O estabelecimento de protocolos utilizando alterações nas bases nitrogenadas da sequência de codificação para o *Hsp 70* e em diferentes tempos de Melting, permitem a diferenciação de espécies de *Leishmania* em ensaios moleculares de amostras de biópsia (Zampieri *et al*, 2016).

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido utilizada nos últimos anos, por apresentar menor risco de contaminação e menor manuseio do material, no entanto esta técnica é disponível em pouco centros de pesquisa e não é usada rotineiramente no diagnóstico da LT. Além disso, ela é capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento do alvo amplificado em amostras provenientes de humanos, cães e flebotomíneos (Francino *et al*, 2006; Pennisi *et al*, 2005; Pita-Pereira *et al*, 2009; Ranasinghe *et al*, 2008). A qPCR utilizando gene alvo kDNA (Weirather *et al*, 2011) e *Hsp70* associado a HRM é um método promissor não só para detecção de DNA de *Leishmania*, como também para diferenciação de espécie de *Leishmania* em amostras de lesão (Zampieri *et al*, 2016).

Os métodos atualmente utilizados para pesquisa e diagnóstico de LTA, como pesquisa de parasitos, histopatologia e testes moleculares são feitos a partir de amostras colhidas de forma invasiva, como através de biópsia da lesão (David e Craft, 2009). A coleta invasiva das amostras é de difícil execução em ambientes com poucos recursos e sem especialização técnica

(Boggild *et al*, 2010; Figueroa *et al*, 2009). Além disso a biópsia é incômoda e desconfortável ao paciente (Martins *et al*, 2010)

A biópsia da lesão constitui o principal recurso amostral para conduzir o diagnóstico laboratorial de LT. Ela deve ser efetuada em lesões de aparecimento recente e não traumatizadas. Assim, existem condições especiais nas quais este procedimento seja evitado ou até mesmo não realizado, como por exemplo lesões com tempo de evolução extenso, que estejam escoriadas, ulceradas ou com alterações de pigmentação pós-inflamatórias (Alves *et al*, 2011), bem como em casos de pacientes com deficiência de coagulação (Manocha *et al*, 2011). A biópsia sendo realizada de forma correta engloba a epiderme, a derme e o tecido celular subcutâneo (Brasil, 2007). Desta forma, é um método extremamente invasivo, que oferece riscos ao paciente, desde a complexidade do procedimento, considerado microcirúrgico, até pelos cuidados necessários após a obtenção do material.

Outros métodos de coleta comum na LT é a punção aspirativa da lesão, que é realizada após injeção de 0,3 mL de solução salina estéril na borda da lesão e a escarificação, onde se utiliza uma lâmina de bisturi estéril para a raspagem da borda interna da lesão. O material obtido é posto em lâminas de microscopia, fixado, corado e observado posteriormente em microscopia óptica (Brasil, 2007). Cabe ressaltar o constrangimento no qual os pacientes são submetidos, no que se refere à exposição demasiada para o diagnóstico da doença, além do sofrimento inerente à situação de enfermidade (Araújo, 2013).

A existência de métodos eficazes e não invasivos para a avaliação diagnóstica da LT (Corvalan *et al*, 2011; Garcia *et al*, 2007b; Mimori *et al*, 2002) e a detecção precoce de LM associada à LC pode favorecer a detecção e o tra-

tamento precoce desta patologia, diminuindo assim, a cronificação e complicações causadas pela doença. No entanto, há dificuldades para a validação de alguns destes métodos, que podem decorrer devido à escassez de pacientes nas áreas cujos trabalhos foram realizados. Além disso, pouco foi comentado no que se refere à avaliação da eficácia dos mesmos (Araújo, 2013).

Uma técnica atualmente empregada é coleta de swab nasal ou de lesão cutânea e realização de PCR para detecção de DNA de *Leishmania*. Os resultados iniciais apresentam sensibilidade e especificidade variáveis, dependendo do local da coleta, do método para recuperação do DNA e do teste molecular empregado (Vries *et al*, 2015). Apesar desta variação de resultados, o swab vem sendo empregado na prática clínica diária devido à sua facilidade de coleta, não provocar desconfortos no paciente e ter boa sensibilidade (Boggild *et al*, 2011a).

Adams *et al* (2014) avaliaram a utilização do swab e de amostras de aspirado da lesão de pacientes com LC comparando com o diagnóstico convencional para LT, sendo que a coleta com swab combinada com a extração de DNA com kit Qiagen provou ser mais eficiente que as demais, demonstrando melhor sensibilidade e especificidade após realização de qPCR. Resultados satisfatórios também foram encontrados na utilização de swab bucal para detecção de co-infecção de leishmaniose visceral e HIV, sendo mostrada uma sensibilidade de 86,3% e especificidade de 98,3% (Das *et al*, 2014). Além disso existem relatos do uso desta ferramenta para o diagnóstico da LV canina (Ferreira *et al*, 2008; Leite *et al*, 2011; Pereira *et al*, 2016), a partir da coleta de material da conjuntiva ocular dos animais e posterior análise molecular por PCR.

2. JUSTIFICATIVA

O diagnóstico de LT continua a ser um problema devido ao amplo espectro clínico da doença e pelo fato das lesões poderem se confundir com outras doenças, incluindo a Hanseníase, infecções fúngicas, câncer de pele, úlceras tropicais, úlceras por micobactérias e infecções estafilocócicas (OMS, 2010). O tratamento da LC na América Latina requer injeções diárias de antimonial pentavalente por até 20 dias (Brasil, 2011a). Diante disso, a diferenciação da leishmaniose de outras doenças e a prevenção de uso excessivo destas drogas tóxicas exigem testes de diagnóstico altamente específico. Diagnósticos sensíveis também são importantes porque algumas espécies de *Leishmania* podem causar manifestações dérmicas crônicas e envolvimento das mucosas, frequentemente caracterizadas pela escassez de parasitas no local da lesão (Adams *et al*, 2014).

A LM, também denominada espúndia, é condição de difícil tratamento e prognóstico sombrio quanto à possibilidade de cura clínica (Marsden, 1986). Estima-se que 3 a 5% dos casos de LC desenvolvam lesão mucosa, no Brasil. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática dos parasitos (Brasil, 2007) e está relacionada com o tratamento inicial inadequado da LC (Llanos-Cuentas *et al*, 1984), pois geralmente surge após a sua cura clínica, com início insidioso e pouca sintomatologia (Brasil, 2007). Entretanto, é a forma mais temida de LT porque pode produzir lesões destrutiva e desfigurantes (Passi *et al*, 2014). A identificação de lesão mucosa em pacientes com doença cutânea primária ativa sugere que muitos casos de LM tardia já podem apresentar alterações mucosas no momento do diagnóstico das lesões cutâneas primárias (Andrade *et al*, 2005).

O diagnóstico de rotina da LTA é baseado na demonstração do parasito por exame microscópico e cultivo *in vitro* dos protozoários, além de exames imunológicos e sorológicos (Faber *et al*, 2003). A amostra biológica utilizada para o diagnóstico da doença é majoritariamente a obtenção de uma biópsia da borda da lesão, procedimento extremamente invasivo e que apresenta riscos ao paciente, como a infecção do local examinado (Araújo, 2013). Os métodos atualmente utilizados requerem pessoal bem treinado e experiente, apoio laboratorial e controle de qualidade. Embora a especificidade deva ser 100% devido à visualização do parasita, a sensibilidade pode ser variável (Saraiva *et al*, 1998). Ressalta-se ainda a quase inviabilidade da prática da coleta em crianças e em indivíduos nos quais as lesões localizam-se em áreas sensíveis do corpo.

Os métodos moleculares tornaram-se ferramentas atraentes para o diagnóstico de leishmaniose por fornecer detecção sensível e específica, rápida e confiável dos parasitos. Vários métodos de amplificação molecular foram desenhados para o diagnóstico de LTA (Ramirez *et al*, 2000; Van der Meide *et al*, 2008; Espinosa *et al*, 2009; Adams *et al*, 2010; Hu *et al*, 2012; Miranda *et al*, 2012; Jara *et al*, 2013), mas poucos foram avaliados quanto à precisão e especificidade diagnóstica em estudos sobre a inclusão e avaliação de pacientes com suspeita de LT em vez de casos positivos e negativos já confirmados (Boggild *et al*, 2010; JARA *et al.*, 2013).

A precisão do diagnóstico de ensaios moleculares pode variar dependendo da amostra usada e método de recuperação de DNA, bem como do alvo molecular e do protocolo utilizado (Adams *et al*, 2014). Poucas tentativas foram feitas para comparar a utilidade de diferentes procedimentos de coleta de amostras de lesão para aplicação de PCR no diagnóstico de LT (Matsumoto *et*

al, 1999), suportando a utilização de metodologias não invasivas tais como *im-print* das lesões em papel filtro e utilização de swab citológico (Mimori *et al*, 2002; Boggild *et al*, 2011b). Os métodos simples de coletas não invasivas de amostras associado a protocolos de extração de DNA padronizados e genes alvo eficientes para o diagnóstico da doença promoveria a otimização do teste, redução de custos e rapidez na detecção da doença e evitaria procedimentos de coleta invasivos e dolorosos, como biópsias da lesão.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

3.1.1 Avaliar a eficácia de método não invasivo para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana através de técnicas de PCR e realizar a detecção precoce de *Leishmania* em mucosa em pacientes com lesão cutânea, através da detecção de DNA de *Leishmania* em amostras colhidas por método não invasivo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Comparar a especificidade e sensibilidade da detecção de DNA em amostra de lesão de pacientes com leishmaniose tegumentar colhida pela técnica convencional de biópsia e de swab.

3.2.2 Comparar a eficácia de dois diferentes alvos de DNA de *Leishmania* na detecção em amostras colhidas por swab.

3.2.3 Determinar se pacientes com leishmaniose cutânea ativa apresentam DNA de *Leishmania* em mucosa nasal íntegra, sem evidência de lesão, como possível marcador de início de doença.

3.2.4 Avaliar a possibilidade de utilização de método não invasivo, swab de mucosa com uso da PCR, como possível metodologia para avaliação de resposta terapêutica e detecção de recidiva.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Sujeitos de pesquisa

Para composição da coorte foram incluídos pacientes com lesão cutânea e/ou mucosa ativas sugestivas de leishmaniose ou que estavam em acompanhamento pós tratamento de leishmaniose e que foram atendidos no ambulatório de Leishmanioses do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, no período de agosto de 2013 a julho de 2015.

O controle negativo foi realizado através da coleta de amostra do septo nasal de 10 voluntários saudáveis, do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo.

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética do IIER (CAAE nº 07801112.1.0000.0061 e Parecer nº 326/644), bem como pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de pesquisa nº 069/14). Todos os pacientes foram informados dos procedimentos do estudo e consentiram com sua participação, tanto os pacientes da coorte de leishmaniose, como os controles.

4.1.2 Amostras biológicas

Dos pacientes com suspeita de leishmaniose foram coletadas amostras da lesão cutânea ativa e da mucosa nasal ou então somente da mucosa nasal ou oral se fossem casos suspeitos de LM. Daqueles que faziam o controle pós-tratamento foram coletadas amostras de mucosa do local da lesão cicatrizada e previamente tratada.

Amostras clínicas obtida por swab: As amostras das lesões cutânea e da mucosa foram coletadas com swab citológico de acordo com Boggild *et al* (2011a). Depois de remover qualquer ferida sobreposta, ou crosta, com gaze umedecida e de realizar a limpeza do local, o swab foi esfregado no sentido horário sobre a lesão por cinco vezes e em seguida foi embebido em 500 µL de álcool etílico a 100%.

Biópsia da lesão: As amostras das lesões cutâneas e da mucosa foram obtidas através de biópsia da lesão de acordo com a rotina estabelecida no ambulatório de Leishmanioses do IIER. Duas pequenas amostras de fragmentos de aproximadamente 3 mm foram obtidas da lesão, sendo um fragmento enviado para exame histopatológico na rotina hospitalar e outro fragmento enviado ao Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (LIM38 HC-FMUSP) para pesquisa direta, cultura de *Leishmania* e realização de PCR para diagnóstico de leishmaniose.

Adicionalmente, foi coletado sangue periférico para realização de testes sorológicos (ELISA e IFI) para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (LIM38 HC-FMUSP) como métodos auxiliares utilizados na rotina para diagnóstico de LT.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pesquisa do parasito

Para a pesquisa direta do parasito os esfregaços em lâminas foram corados pelo Giemsa e a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp. foi feita sob microscopia óptica comum na rotina do diagnóstico de LT.

4.2.2 Sorologia para *Leishmania*

A detecção de anticorpos anti-*Leishmania* foi realizada pela rotina, no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, utilizando-se as técnicas de imunofluorescência e ELISA, utilizando antígenos totais de promastigotas de *Leishmania major-like*.

4.2.3 Reação de Montenegro

A reação intradérmica de Montenegro foi realizada no Instituto Adolfo Lutz, com se segue: foi administrado 0,1ml do antígeno de *Leishmania amazonensis* a 3 cm da dobra cubital no antebraço, sendo a induração mensurada após 72 horas. O teste foi considerado positivo quando a induração for maior ou igual a 5mm.

4.2.4 Extração de DNA provenientes de swab citológico:

Todas as amostras clínicas foram submetidas ao procedimento de extração de DNA com o kit de Qlamp DNA Mini Kit (QIAGEN Inc., Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, as amostras foram centrifugadas a 5 minutos por 3000 x g, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 400µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), 20µL de proteinase K e 400µL do tampão de lise “AL” da Qlamp. Essa solução foi

homogeneizada e colocada em repouso por 10 minutos a 56°C. Em seguida foram crescidos a esta solução, 400µL de etanol absoluto e a mistura foi homogeneizada. 700µL dessa solução foram transferidos para a coluna do kit QIAamp, e em seguida realizado centrifugação a 1 minuto por 6.000 x g. Após a centrifugação, o tubo contendo o filtrado foi desprezado, foi acoplado novo tubo a coluna e em seguida acrescidos 500 µL do tampão “wash 1”, a coluna foi centrifugada a 1 minuto por 6.000 x g. O tubo contendo o filtrado foi desprezado novamente e então acrescentados a esta coluna 500 µL do tampão “wash 2”. A centrifugação foi repetida novamente a 20.000 x g por 3 minutos e o filtrado desprezado. A esta coluna, foram acrescidos 50µL do tampão de eluição “AE”, e a solução deixada em temperatura ambiente por 1 minuto, e em seguida centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. O filtrado obtido após a centrifugação (contendo o DNA) foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.2.5 Verificação da qualidade das amostras de DNA obtidas:

A quantidade e a pureza do DNA genômico foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000, marca Thermo Fisher Scientific Inc., USA). Utilizou-se 1 µl do tampão de eluição “AE” como branco e 1 µl de DNA da amostra a ser quantificada. Todas as reações foram realizadas em locais apropriados, seguindo-se as boas práticas de laboratórios para evitar a contaminação da amostra e 50 ng de DNA foram utilizados para a realização da PCR com os diferentes alvos. Foram utilizadas somente as amostras que tinham relação de absorbância 260/280 entre 1,6 e 2,0.

4.2.6 PCR para controle da extração de DNA

Para realização do controle da extração de DNA, o DNA genômico foi amplificado utilizando-se a PCR com iniciadores para o gene constitutivo da beta-globina (268pb) (Al-Jawabreh *et al*, 2004). As reações de PCR para beta-globina tiveram volume final de 25µL, sendo: 15,77 µL de H₂O, 1,5 µL MgCl₂ 25mM, 1,25 µL de 10mM de cada primer, 0,1 µL da enzima Taq Polymerase (500 ui), 2,5 µL de tampão 10X, 0,5 µL de dNTP's 10mM e 1,5 µL de amostra de DNA, utilizando os iniciadores *HβG-F* (5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3') e *HβG-R* (5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3') que amplificaram fragmentos de 268pb.

As reações foram realizadas em termociclador modelo Veriti (Life Technologies, Carlsbac, California, USA) utilizando um ciclo inicial de 2 minutos a 95°C, 35 ciclos (cada um: 20 segundos a 95°C; 30 segundos a 53°C; 1 minuto a 72°C) e uma extensão final de 6 minutos a 72°C

4.2.7 Reação em Cadeia da Polimerase para DNA de Cinetoplasto (kDNA)

Foram utilizados os iniciadores descritos por Volpini *et al* (2004) para região conservada do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* kDNA 20 (5'-GG KAG GGG CGT TCT SCG AA-3') e kDNA 22 (5'-SSS WCT ATW TTA ACA CAA CCC C-3') que amplificaram fragmentos de 120pb. As reações de PCR para kDNA tiveram volume final de 20µL, sendo: 11,1 µL de H₂O, 0,8 µL MgCl₂ 25mM, 0,75 µL de 10mM de cada primer, 0,2 µL da enzima Taq Polymerase (500 ui), 2,0 µL de tampão 10X, 0,4 µL de dNTP's 10mM e 4,0 µL de amostra de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Life

Technologies, Carlsbac, California, USA) utilizando um ciclo inicial de 4 minutos a 94°C, 35 ciclos (cada um: 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 58°C; 30 segundos a 72°C) e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

4.2.8 Reação em Cadeia da Polimerase para de detecção DNA tendo como alvo o gene *Hsp70* (Heat shock protein 70 Kda)

Foram utilizados iniciadores específicos para *Leishmania* spp. (Hsp70) F1E (5'- CCC TCG TGT CGG ACT TCT T-3') e R1E (5'- CTC CGT CTG CTT GCT CTT G -3') que amplificaram fragmentos de 125pb. As reações de PCR para Hsp70 tiveram volume final de 25µL, sendo: 16,05 µL de H₂O, 1,5 µL MgCl₂ 25mM, 1,5 µL de 10mM do primer F1E e R1E, 0,2 µL da enzima Taq Polymerase, 2,5 µL de Buffer 10X, 0,75 µL de dNTP's 10mM e 1,0 µL de amostra de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador Veriti (Life Technologies, Carlsbac, California, USA) utilizando um ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, 35 ciclos (cada um: 30 segundos a 94°C; 30 segundos a 60°C; 30 segundos a 72°C) e uma extensão final de 7 minutos a 72°C.

4.2.9 Análise dos produtos de PCR

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Biotools/M&B Laboratories, S. A., Uniscience do Brasil, São Paulo, Brasil) 2,0 % a 80 Volts durante 1 hora. A presença de amplificação foi observada em transiluminador Macrovue (Pharmacia Bioscience, Upsala, Suécia), sob luz UV após coloração do gel com solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL e fotodocumentados com sistema digital Power Shot S215 (Cannon, NY, USA). Marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a leitura da amplificação.

4.2.10 Controle dos ensaios

Para evitar contaminação de amostras, as etapas de extração de DNA de amostras de cultura e amostras clínicas, preparação da solução de Mix e adição do DNA na solução de Mix foram realizadas em salas diferenciadas.

Como controle negativo da reação utilizamos uma alíquota de H₂O livre de DNA e RNA. Como controle positivo das reações de beta-globina, de kDNA e de Hsp70 foram utilizadas amostras de DNA humano e de *Leishmania braziliensis*, respectivamente.

4.2.11 Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis de kDNA – (PCR-RFLP).

Os produtos de reação de kDNA foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *HaeIII FastDigest*[®] (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as especificações do fabricante, 10 µl dos produtos positivos da PCR foram digeridos a 37°C durante cinco minutos com 10 U da enzima de restrição, com tampão específico e água ultra pura, em volume final de 30 µl. Os produtos obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida

10% e corados com brometo de etídio. De acordo com Volpini *et al* (2004), esta técnica tem potencial para diferenciação de *L. (V.) braziliensis* de outras espécies de *Leishmania* decorrente do padrão de clivagem em amostras infectadas com esta espécie.

4.2.12 Reação em Cadeira de Polimerase em Tempo Real (qPCR) com sistema Syber Green

A técnica foi realizada utilizando iniciadores específicos para *Leishmania* spp. (Hsp70) F1E (5'- CCC TCG TGT CGG ACT TCT T-3') e R1E (5'- CTC CGT CTG CTT GCT CTT G -3'). As reações de PCR em Tempo Real tiveram volume final de 25 µL, sendo: 10,5 µL de H₂O, 12,5 µL Mix (Marca UBS), 0,5 µL de 10 mM de cada primer e 1,0 µL de amostra na concentração de DNA de 30 ng/µL. As amostras foram analisadas em triplicatas.

4.2.13 Referência Padrão

O diagnóstico de LT foi confirmado quando qualquer teste de rotina foi positivo, onde os testes referem-se à biópsia com exame histopatológico, PCR de biópsia, Pesquisa Direta de Parasito, Cultura, Reação de Montenegro e Sorologia (ELISA e IFI). Estes sete testes serviram como padrão de referência contra o qual foram comparados os resultados dos testes deste estudo.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizado o teste qui-quadrado e exato de Fisher.

5. RESULTADOS

5.1 SUJEITOS DE PESQUISA E VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA OBTIDAS

Foram analisadas 97 amostras de swab provenientes de 57 pacientes atendidos no ambulatório de Leishmanioses do IIER de São Paulo no período de agosto de 2013 a julho de 2015, sendo 30 pacientes com suspeita de LTA ativa (11 com lesões cutâneas e 19 com lesões mucosas), 31 pacientes controle pós-tratamento para a LM (Tabela 1) e 14 pacientes com LC ou LM ativa ou tratada que foram submetidos à análise da mucosa nasal íntegra.

A diferença no número total de pacientes e de amostras analisadas se dá devido à presença de amostras de mesmo paciente em período de atividade da doença e em período pós-tratamento.

Tabela 1: Distribuição dos pacientes quanto ao tipo de Leishmaniose e decurso da doença.

Doença	Decurso da Doença	
	Suspeita	Pós-tratamento
L. Cutânea	11	-
L. Mucosa	19	31
Total	30	31

Foi verificada a localidade de origem dos pacientes para fins epidemiológicos e foi constatado que 19,3% das amostras eram de pacientes do estado da Bahia, 18,3% do estado de São Paulo, 8,6% de Minas Gerais, 1,9% do Pará e a mesma porcentagem do Piauí, simultaneamente 0,96% das amostras eram de pacientes originários de Pernambuco, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e da Bolívia e em 46,16% das amostras a origem do paciente era desconhecida.

De acordo com a quantificação do DNA extraído, a quantidade média de DNA recuperado do swab foi de 23,88 ng/ μ L, tendo variação de 2,7 ng/ μ L a 211,1 ng/ μ L. Quando analisado a quantificação de DNA dos pacientes controle pós-tratamento obteve-se uma concentração média de DNA de 19,1 ng/ μ L, em pacientes com suspeita de LC de 19,9 ng/ μ L de pacientes com LM de 32,64 ng/ μ L. A média do grau de pureza das amostras foi de 1,93 (Abs 260/280) (Tabela 2).

Tabela 2: Dados referentes a quantificação média de DNA recuperado a partir de coleta de amostras clínicas com swab citológico e do grau de pureza do DNA relacionados com amostras clínicas provenientes de pacientes com suspeita de leishmaniose cutânea, suspeita de leishmaniose mucosa e pacientes pós-tratamento.

Tipo de amostras	Média Concentração de DNA (ng/μL)	Abs 260/280
Suspeita de L. cutânea	19,9	1,95
Suspeita de L. mucosa	32,64	1,94
Pós-tratamento	19,1	1,89
Total	23,88	1,93

Os resultados obtidos demonstram um baixo índice de recuperação do DNA das amostras provenientes de coleta com swab citológico, porém com grau de pureza satisfatório.

5.2 PCR PARA CONTROLE DA EXTRAÇÃO DE DNA

Submeteram-se neste método, todas as amostras de DNA obtidas das amostras clínicas colhidas com swab, além do controle negativo a detecção de do gene da beta-globina, como controle de extração de DNA.

Figura 6: Ensaio de PCR para detecção do gene Beta-Globina com primers *HβG-F* e *HβG-R*. Figura de revelação em gel agarose a 2%. Amostra 1 Ladder de 100pb; amostras 2 a 9 amostras clínicas, amostra 10 controle positivo e amostra 11 controle negativo.

Os resultados obtidos demonstram que todas as amostras submetidas ao ensaio amplificaram de acordo com o tamanho esperado do produto de PCR demonstrando efetividade na extração de DNA efetuada (Figura 6).

Houve a separação das amostras de paciente com doença ativa, pós-tratamento e controle em todas as reações de PCR, analisando-as em momentos diferentes a fim de evitar contaminação entre as amostras.

5.3 RESULTADO DOS PACIENTES COM DOENÇA ATIVA E COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS TRADICIONAIS

No presente estudo foram incluídos 30 pacientes, 19 com suspeita de LM e 11 de LC. Seis pacientes com suspeita de doença mucosa (31,5%) tinham histórico de lesão cutânea no passado. Todos os pacientes estudados apresentaram testes positivos para pelo menos um exame de rotina para detecção da enfermidade (Tabela 3 e Tabela 4), sendo todos diagnosticados

com leishmaniose ativa. Os exames de rotinas foram realizados de acordo com o pedido médico e desta forma houve diferença no total de análises feitas entre os pacientes. Foram realizados os exames de PCR de biópsia em 26 pacientes, cultura em 11, pesquisa direta em 15, histopatologia em 13, reação de Montenegro em 19, ELISA em 22 e IFI em 21 amostras, com positivities respectivas de 96,1%, 81,8%, 100%, 38,5%, 78,9%, 72,7% e 47,6% dos exames realizados.

Tabela 3: Resultados de exames de rotina de 11 pacientes com diagnóstico de leishmaniose cutânea atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.

Doença Suspeita	PCR da Biópsia	Cultura	Pesquisa Direta	Histopatológico	RM	ELISA	IFI
LC	Pos	NR	Pos	NR	NR	NR	NR
LC	Pos	NR	Pos	NR	NR	Pos	Neg
LC	Pos	Pos	Pos	Pos	NR	NR	NR
LC	Pos	Pos	Pos	NR	NR	NR	NR
LC	Pos	Pos	Pos	NR	Pos	Pos	Neg
LC	Pos	NR	Pos	NR	NR	Neg	Neg
LC	Pos	NR	NR	NR	Pos	Pos	Neg
LC	Pos	Pos	Pos	NR	NR	Neg	Neg
LC	Pos	NR	Pos	NR	Pos	Pos	Pos
LC	Pos	Neg	Sug	Neg	Neg	NR	NR
LC	Pos	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Abreviações: LC: Leishmaniose Cutânea; RM: Reação de Montenegro; IFI: Imunofluorescência Indireta; Pos: Positivo; Neg: negativo; Sug: Sugestiva; NR: Não realizado.

Tabela 4: Resultados de exames de rotina de 19 pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Mucosa atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.

Doença Suspeita	PCR da Biópsia	Cultura	Pesquisa Direta	Histopatológico	RM	ELISA	IFI
LM	Pos	NR	NR	Neg	Pos	Neg	Neg
LM	Pos	NR	NR	Pos	Pos	NR	NR
LM	Pos	NR	NR	Neg	Neg	Pos	Neg
LM	Pos	NR	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos
LM	Pos	Pos	NR	Neg	Pos	Neg	Pos
LM	Pos	Neg	Sug	NR	Neg	Neg	Neg
LM	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos
LM	Pos	NR	NR	NR	NR	Pos	Neg
LM	Pos	NR	NR	NR	NR	NR	NR
LM	Pos	NR	NR	NR	Pos	Pos	Pos
LM	Pos	Pos	Pos	Neg	Pos	Pos	Pos

LM	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos	Pos
LM	Pos	NR	Pos	NR	Pos	NR	NR
LM	Pos	NR	NR	NR	NR	Pos	Pos
LM	Neg	NR	NR	NR	Pos	Pos	Neg
LM	NR	NR	NR	Pos	Pos	Pos	NR
LM	NR	NR	NR	Pos	Pos	Pos	Pos
LM	NR	NR	NR	NR	NR	Pos	Pos
LM	NR	Pos	NR	Neg	Pos	Pos	Neg

Abreviações: LM: leishmaniose Mucosa; RM: Reação de Montenegro; IFI: Imunofluorescência Indireta; Pos: Positivo; Neg: negativo; Sug: Sugestiva; NR: Não realizado.

Após a confirmação de leishmaniose, analisou-se a sensibilidade do diagnóstico utilizando o swab como coleta das amostras. Para isso foram colhidas 33 amostras do local da lesão dos 30 pacientes estudados, 22 amostras de suspeita de LM e 11 de suspeita de LC. Três pacientes com LM tinham lesão na mucosa nasal e oral, por isso o número total de amostras supera o de pacientes.

Os resultados da PCR-kDNA de amostras proveniente do swab, apresentaram positividade em 30 amostras e três foram negativas (figura 7). As amostras negativas são de pacientes diferentes, sendo dois com LM (um com histopatológico, reação de Montenegro, ELISA e IFI positivos para *Leishmania* spp., e o outro com PCR-kDNA de biópsia e ELISA positivos) e um paciente com LC (com cultura, PCR-kDNA de biópsia e pesquisa direta positivos para a doença), sendo assim caracterizados como portadores de LTA. PCR-kDNA aplicada em amostras provenientes de swab demonstrou ter sensibilidade e especificidade de 94,1% e 80%, respectivamente.

Figura 7: Ensaio de PCR para detecção do kDNA com primers *kDNA 20* e *kDNA 22*. Figura de revelação em gel agarose a 2%. Amostra 1 Ladder; amostras 2 a 5 representando amplificação das amostras clínicas positivas para kDNA, amostra 6 controle positivo e amostra 7 controle negativo.

Quando comparado o desempenho deste teste entre as amostras coletadas com swab e com biópsia observou-se uma concordância de 88,9%, pois 24 amostras positivas pelo PCR-kDNA de biópsia se mostram positivos também no PCR-kDNA de swab (tabela 5) ($p = 0,92$).

Tabela 5: Análise da comparação de testes diagnósticos da avaliação de 33 amostras de pacientes com suspeita de Leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.

PCR-kDNA de Biópsia	PCR-kDNA de swab		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	24	2	26
Negativa	1	0	1
Não Realizado	5	1	6
Total	30	3	33

Analisando os resultados da PCR-KDNA de swab separadamente para pacientes com LM e com LC, encontrou-se positividade de 90,9% (20/22) para amostras de mucosa e 90,9% (10/11) para amostras de lesão cutânea. Entretanto, não houve diferença significativa na aplicação do teste nas diferentes

formas da doença ($p= 0,71$). As 30 amostras clínicas positivas para PCR-kDNA de swab revelaram ser *L. braziliensis* (80 e 40 pb) através do padrão de corte da enzima *HaeIII* – 80pb e 45pb (figura 8).

Figura 8: Ensaio de clivagem com enzima de restrição *HaeIII*. Figura de revelação em gel de poliacrilamida a 10%. Amostra 1 e 11 Ladder de 50pb; amostras 2 a 8 representando clivagem dos fragmento de amplificação para kDNA de amostras clínicas, amostras 9 e 10 controle positivo (*L. braziliensis* e *L. amazonenses*, respectivamente).

Foi realizada PCR com o iniciador Hsp70 em 23 amostras de biópsia dos 30 pacientes estudados, demonstrando positividade em 20 delas. Dos resultados positivos, oito eram de pacientes com suspeita de LC e 12 de LM. Dezenove das 20 amostras positivas (95%) eram positivas também para a PCR-kDNA de biópsia ($p=0,86$), o paciente da amostra com PCR-Hsp70 positivo e PCR-kDNA negativo tinha LM e apresentou teste de Montenegro e ELISA positivos para o diagnóstico da doença. As três amostras de biópsia negativas para PCR-Hsp70 eram positivas para PCR-kDNA de mesmo material, onde uma demonstrou positividade no teste de Montenegro, ELISA e IFI, uma com Montenegro e ELISA positivos e uma amostra com pesquisa

direta sugestiva de *Leishmania* sp.

As 33 amostras coletadas através de swab foram submetidas também a PCR-Hsp70, sendo que 14 mostraram-se positivas e 19 negativas, demonstrando sensibilidade e especificidade de 42,4% e 100%, respectivamente. Os resultados positivos da PCR-Hsp70 de swab analisados separadamente para pacientes com LM e com LC, demonstrou positividade de 31,8% (7/22) para amostras de mucosa e 63,6% (7/11) para amostras cutâneas.

Figura 9: Ensaio de PCR para detecção do Hsp70 com primers *F1E* e *R1E*. Figura de revelação em gel agarose a 1,5%. Amostra 1 e 10 Ladder; amostras 2 controle positivo, amostras 3 a 8 representando a não amplificação das amostras clínicas positivas para kDNA e amostra 9 controle negativo.

Uma amostra de swab de paciente com LC demonstrou negatividade para PCR-kDNA e positividade para PCR-Hsp70, sendo positiva em três exames de rotina (PCR-kDNA de biópsia, cultura e pesquisa direta do parasito). Dezesete das 19 amostras negativas para PCR-Hsp70 mostraram-se positivas para PCR-kDNA de swab e duas amostras foram negativas para

ambos os testes (tabela 6) ($p=0,61$). Uma amostra positiva para PCR-kDNA e PCR-Hsp70 de swab, proveniente de paciente com LM mostrou-se negativa para PCR-kDNA de biópsia, porém foi positiva na PCR-Hsp70 de biópsia, reação de Montenegro e ELISA.

Tabela 6: Análise da comparação de testes diagnósticos com diferentes alvos de PCR na avaliação de 33 amostras coletadas através de swab de pacientes com suspeita de Leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.

	LC			LM		
	Positivo N (%)	Negativo N (%)	Total	Positivo N (%)	Negativo N (%)	Total
PCR-Hsp70	7 (63,6%)	4 (36,4%)	11	7 (31,8%)	15 (68,2%)	22
PCR-kDNA	10 (90,9%)	1 (0,1%)	11	20 (90,9%)	2 (0,1%)	22

Abreviações: LC: Leishmaniose Cutânea; LM: leishmaniose Mucosa; N: Número de amostras positivas para os testes realizados; %: Percentual de positividade dos testes.

Quando comparados PCR-Hsp70 da biópsia e do swab obteve-se divergência em 13 das 23 amostras analisadas, sendo uma amostra de biópsia negativa e 12 positivas (tabela 7). Esta amostra que demonstrou negatividade em PCR-Hsp70 de biópsia e positividade para amostras de swab era de paciente com LC com reação de Montenegro e ELISA positivos. Das 12 amostras positivas em PCR-Hsp70 de biópsia e negativas para amostras de swab, todas tinham ao menos um teste diagnóstico de rotina que não PCR positivos sendo nove provenientes de pacientes com LM e três de pacientes com LC. A diferença da aplicação do iniciador Hsp70 em amostras de biópsia e em amostras de swab não demonstrou significância estatística ($p=0,66$).

Tabela 7: Análise da comparação de testes diagnósticos com alvo Hsp70 na avaliação de 23 amostras coletadas através de biópsia e de 33 amostras de swab de pacientes com suspeita de Leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.

PCR-Hsp70 de Biópsia	PCR-Hsp70 de swab		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	8	12	20
Negativa	1	2	3
Não Realizado	5	5	10
Total	14	19	33

Aplicou-se a qPCR com alvo Hsp70 em 23 amostras provenientes de biópsia, foi demonstrado positividade em 13 amostras e negatividade em 10. Todas as amostras positivas para este teste foram concordantes com os resultados da PCR-Hsp70 convencional e da PCR-kDNA realizadas a partir de material de biópsia. Entretanto, sete das 10 amostras negativas na qPCR demonstraram positividade na PCR-Hsp70 convencional e apenas uma destas amostras era negativa na PCR-kDNA de biópsia. Quatro destas amostras divergentes era de pacientes com LM (uma com cultura, pesquisa direta, histopatológico e testes sorológicos positivos, uma com cultura, pesquisa direta e testes sorológicos positivos, uma com Montenegro e ELISA positivos e uma somente com ELISA positivo) e três de pacientes com LC (uma com cultura, pesquisa direta, Montenegro e ELISA positivos, uma com cultura e pesquisa direta positivos e uma com pesquisa direta positiva). Na análise realizada, ficou demonstrado que a utilização da PCR-Hsp70 convencional e de qPCR-Hsp70 em amostras de biópsia tem a mesma efetividade ($p=0,06$) e o mesmo aconteceu no último teste comparado à PCR-kDNA ($p=0,43$).

A qPCR também foi aplicada nas 33 amostras provenientes de swab. Destas, 13 demonstram-se positivas e 20 negativas demonstrando sensibilidade

de 39,4%. Das amostras positivas, 38,5% (5/13) mostraram divergência entre a técnica de PCR convencional e qPCR utilizando o mesmo alvo (tabela 8), sendo duas amostras de pacientes com LC e três de LM. Em contrapartida, seis das 20 amostras negativas para qPCR eram positivas em PCR convencional, quatro de pacientes com suspeita de LC e duas de LM.

Tabela 8: Análise da comparação de testes diagnósticos com mesmo alvos em PCR convencional e qPCR na avaliação de 33 amostras coletadas através de swab de pacientes com suspeita de Leishmaniose atendidos no IIER no período agosto/2013 a julho/2015.

PCR-Hsp70	qPCR-Hsp70		Total
	Positiva	Negativa	
Positiva	8	6	14
Negativa	5	14	19
Total	13	20	33

Ao comparar os resultados da qPCR de amostras de swab e de biópsia encontrou-se uma diferença quantitativa, entretanto estatisticamente os resultados não divergem ($p= 0,63$). Dos 13 pacientes positivos em qPCR de biópsia apenas cinco apresentaram positividade no ensaio feito com as amostras de swab, sendo três de LM e dois de LC. Em concordância com estes resultados, dos 10 pacientes que se mostraram negativos para qPCR de biópsia, apenas seis apresentaram o mesmo padrão de resultado para o ensaio feito com as amostras de swab, sendo quatro de LM e dois de LC. Portanto, 12 dos 23 pacientes analisados neste ensaio mostraram divergência nos resultados da mesma técnica realizado com material proveniente de biópsia e de swab.

Os resultados da qPCR de swab analisados separadamente para pacientes com LM e com LC, demonstrou positividade de 36,4% (8/22) para amostras de mucosa e 45,5% (5/11) para amostras cutâneas, esses resultados demonstram a mesma efetividade do teste quando aplicado para LM e LC ($p=0,44$).

A concordância entre todos os testes moleculares em amostras provenientes de swab foi de 40,9% entre PCR-kDNA / PCR-Hsp70 ($p=0,45$), 45,5% entre PCR-kDNA / qPCR ($p=0,39$) e 77,3% entre PCR-Hsp70 / qPCR ($p=0,03$) de amostras de LM e 54,5%, 36,4% e 45,5% entre PCR-kDNA / PCR-Hsp70 ($p=0,63$), PCR-kDNA / qPCR ($p=0,45$) e PCR-Hsp70 / qPCR ($p=0,65$) de amostras de LC, respectivamente. Não houve diferença significativa na comparação dos três testes em relação às formas de coleta e a única significância encontrada foi entre os testes PCR-Hsp70 e qPCR de amostras de swab de pacientes com LM. Entretanto, ficou evidente que para o material coletado com swab, o teste PCR-kDNA é superior aos de PCR-Hsp70 e qPCR, assim como em amostras de biópsia os indicadores PCR-kDNA e PCR-Hsp70 demonstraram resultados melhores em relação ao qPCR.

Ao analisar a relação dos resultados dos testes propostos com os exames de rotina para diagnóstico de Leishmaniose, encontrou-se boa concordância de PCR-kDNA de swab com os testes PCR-kDNA de biópsia, PCR-Hsp70 de biópsia, pesquisa direta, teste de Montenegro e de ELISA tanto para paciente com LM e LC, além da cultura e IFI para pacientes com LM. A menor concordância deste teste ocorreu na comparação com o teste IFI para LC e histopatológico para LM. O teste PCR-Hsp70 de swab demonstrou concordância mediana e baixa entre os testes de rotina, assim como qPCR-Hsp70 de

swab. A melhor concordância do último teste foi encontrada com o método ELISA de pacientes com LM (Tabela 9).

Tabela 9: Índice de concordância de PCR-kDNA, PCR-Hsp70 e qPCR de swab com testes convencionais para amostras de LC e LM de pacientes com suspeita de Leishmaniose atendidos no IIER no período de agosto/2013 a julho/2015.

TESTES CONVENCIONAIS	LC			LM		
	kDNA % (N)	Hsp70 % (N)	qPCR % (N)	kDNA % (N)	Hsp70 % (N)	qPCR % (N)
PCR-kDNA de Biópsia	90,9% (10/11)	63,6% (7/11)	45,5% (5/11)	86,7% (13/15)	20% (3/15)	26,7% (4/15)
PCR-Hsp70 de Biópsia	77,8% (7/9)	55,6% (5/9)	55,6% (5/9)	78,6% (11/14)	35,7% (5/14)	50% (7/14)
qPCR Hsp70 de Biópsia	66,7% (6/9)	44,4% (4/9)	44,4% (4/9)	64,3% (9/14)	50% (7/14)	50% (7/14)
Cultura	60% (3/5)	40% (2/5)	40% (2/5)	83,3% (5/6)	33,3% (2/6)	33,3% (2/6)
Pesquisa Direta	88,9% (8/9)	66,7% (6/9)	55,6% (5/9)	100% (6/6)	33,3% (2/6)	50% (3/6)
Histopatologia	50% (1/2)	--- (0/2)	50% (1/2)	30,8% (4/11)	69,2% (9/11)	54,5% (6/11)
Reação de Montenegro	75% (3/4)	50% (2/4)	--- (0/4)	93,3% (14/15)	40% (6/15)	46,7% (7/15)
ELISA	83,3% (5/6)	33,3% (2/6)	33,3% (2/6)	75% (12/16)	50% (8/16)	75% (12/16)
IFI	33,3% (2/6)	50% (3/6)	50% (3/6)	75% (12/15)	53,3% (8/15)	53,3% (8/15)

Abreviações: LC: Leishmaniose Cutânea; LM: leishmaniose Mucosa; %: Porcentagem de concordância entre os testes; N: Número de testes concordantes em relação ao total de exames realizados.

5.4 RESULTADOS DOS PACIENTES JÁ TRATADOS

Foram analisadas 50 amostras de swab provenientes de 31 pacientes que realizavam o controle pós-tratamento para leishmaniose atendidos no ambulatório de Leishmanioses do IIER de São Paulo no período de agosto de

2013 a julho de 2015. Todas as amostras eram provenientes de pacientes com LM e o período do término do tratamento variou entre os anos de 2001 e 2015.

Quando submetidas a PCR-kDNA, juntamente com controles positivos e negativos, 43 amostras apresentaram-se positivas ao teste, enquanto sete foram negativas. Após a realização da PCR-kDNA, utilizou-se os produtos das reações positivas para clivagem com a enzima de restrição *HaeIII*, portanto, foram submetidas 43 amostras a esta reação. Destas, 41 mostraram-se positivas para *L. (V.) braziliensis* através da clivagem em fragmentos de 45pb e de 80pb, duas mostraram-se negativa a este perfil demonstrando não se tratar desta espécie de *Leishmania*. Um dos pacientes negativos para *L. (V.) braziliensis* foi tratado em 2013 e os exames de rotina positivos para diagnóstico da doença foram ELISA e IFI, o outro paciente, tratado em 2014, apresentou PCR-kDNA de biópsia positivo, além do teste ELISA, no momento do diagnóstico.

Submeteram-se as 50 amostras a PCR-Hsp70. Houve amplificação em 11 amostras e 39 foram negativas. Uma amostra com positividade em PCR-kDNA e PCR-Hsp70 não demonstrou clivagem em fragmentos do DNA quando incubado com a enzima *HaeIII*, sugerindo não se tratar de *L. (V.) braziliensis*. Não foi realizada a diferenciação desta espécie em três amostras que demonstraram positividade para Hsp70, pois se mostraram negativas para kDNA.

Quando comparados os resultados da PCR-kDNA e da PCR-Hsp70, oito amostras mostraram-se positivas para ambos iniciadores e quatro negativas para ambos os testes, demonstrando baixa concordância entre os ensaios (24%). A maioria das amostras (35/50) apresentaram positividade em PCR-kDNA e negatividade em PCR-Hsp70, enquanto apenas três demonstraram

resultados contrários. Na tabela 10 encontra-se a distribuição da classificação da doença já tratada de pacientes relacionando com os resultados da PCR-kDNA e da PCR-Hsp70.

Tabela 10: Distribuição de pacientes com diagnóstico prévio de LM já tratados, relacionado com o resultado da PCR-kDNA e PCR-Hsp70 atendidos no ambulatório de Leishmanioses do IIER de São Paulo no período de agosto de 2013 a julho de 2015.

	PCR Positiva	PCR Negativa	Total
PCR-kDNA	43	7	50
PCR-Hsp70	11	39	50

Dezoito pacientes (totalizando 22 amostras) que apresentaram positividade na PCR-kDNA e negatividade na PCR-Hsp70 de swab tinham exames com demonstração do parasito positivos no momento do diagnóstico (16 com PCR-kDNA de biópsia, três com culturas, sete com pesquisas diretas e seis com histopatológicos positivos) e 15 pacientes (com 20 amostras) com sorologia positiva (14 com reação de Montenegro, 14 com ELISA e 11 com IFI positivos). Um destes pacientes, totalizando duas amostras, foi tratado duas vezes para LM, em 2001 e em 2009, após apresentar recidiva da doença.

Um paciente tratado em 2014, que demonstrou PCR-kDNA e PCR-Hsp70 de swab positivos, continuava apresentando PCR-kDNA de biópsia positivo mesmo após um ano do término da terapia e neste momento foi diagnosticado com sarcoidose nas narinas através de outros testes laboratoriais.

Ao analisar o resultado dos testes realizados comparando com o tempo do término do tratamento dos pacientes, detectamos que, em média, 15 meses após a terapia o paciente continuava apresentando positividade para PCR-kDNA, 5 meses para PCR-Hsp70 e 4 meses para ambos os testes. A negativi-

dade para PCR-kDNA, PCR-Hsp70 e ambos os testes apareceram em média após 12 meses, 14 meses e 16 meses após o tratamento, respectivamente.

5.5 RESULTADOS DOS PACIENTES COM MUCOSA NASAL ÍNTEGRA E COM DIAGNÓSTICO ATUAL OU PREVIO DE LEISHMANIOSE CUTANEA LOCALIZADA OU LEISHMANIOSE MUCOSA.

Utilizou-se a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de mucosa nasal íntegra, coletadas com swab de pacientes com doença ativa ou tratados com LC e LM que tinham ou tiveram lesões no palato. Ressaltamos que nenhum paciente que participou desta etapa do estudo apresentou lesões na mucosa nasal em algum da doença e que nenhum apresentava manifestação clínica, lesão ou alteração na mucosa nasal no momento da coleta.

Quatorze pacientes provenientes de área endêmica de Leishmaniose foram incluídos neste teste, sete com LC tratada, um com LC ativa, três com LM tratada e três com LM ativa. Os pacientes já tratados estavam realizando controle pós-cura para esta enfermidade, sendo que dois deles com LC obtiveram cura espontânea da doença. Os pacientes que apresentavam LM tratada ou com doença ativa no momento da coleta tinham lesões no palato e/ou úvula, ressalta-se que a mucosa nasal destes pacientes se encontrava íntegra e sem lesões no momento da coleta.

A coleta das amostras de mucosa nasal íntegra em pacientes com lesão ativa de LC e LM com lesão no palato foi efetuada no mesmo dia da coleta de biópsia das lesões para diagnóstico, portanto as análises das amostras fo-

ram realizadas simultaneamente. Todos os quatro pacientes com suspeita da doença tiveram pelo menos um dos testes convencionais utilizados positivos nas amostras das lesões (75% positivo para PCR da biópsia, 50% para pesquisa direta do parasito, 50% para reação de Montenegro e 25% para ELISA). Dos 10 pacientes que apresentavam cura clínica de leishmaniose, dois apresentaram cura espontânea, um realizou o tratamento em 1992 necessitando de novo tratamento em 2014 devido à recidiva da doença, dois tinham terminado o tratamento em 2012, um em 2013, três em 2014 e um em 2015. Todos estavam sendo acompanhados para o monitoramento da pós-terapia.

O fragmento de amplificação de kDNA foi detectado em 13 pacientes analisados, oito destes pacientes tinham LC (sete já foram tratados e um com doença ativa) e cinco tinham LM (três com lesão ativa e dois já tratados). Em todas estas amostras foi demonstrada a presença de *L. braziliensis* por seu padrão de clivagem. A detecção do gene *Hsp70* nas amostras ocorreu em 28,6% dos casos (4/14), sendo dois pacientes com lesão ativa de LM e dois pacientes já tratados para LC (Tabela 11).

Tabela 11: Características clínica e resultados de exames laboratoriais de biologia molecular da mucosa nasal íntegra de pacientes com suspeita de Leishmaniose Cutânea e Mucosa ativa e já tratados para esta enfermidade atendidos no IIER entre agosto de 2013 a julho de 2015.

Doença Suspeita	Status da doença	PCR-kDNA	PCR-Hsp70
LC	Doença Ativa	Positivo	Negativo
LC	Tratamento Prévio	Positivo	Positivo
LC	Tratamento Prévio	Positivo	Positivo
LC	Tratamento Prévio	Positivo	Negativo
LC	Tratamento Prévio	Positivo	Negativo

LC	Tratamento Prévio	Positivo	Negativo
LC	Tratamento Prévio	Positivo	Negativo
LC	Tratamento Prévio	Positivo	Negativo
LM	Doença Ativa	Positivo	Positivo
LM	Doença Ativa	Positivo	Positivo
LM	Doença Ativa	Positivo	Negativo
LM	Tratamento Prévio	Positivo	Negativo
LM	Tratamento Prévio	Positivo	Negativo
LM	Tratamento Prévio	Negativo	Negativo

6. DISCUSSÃO

A disponibilidade de técnicas moleculares com alta sensibilidade e especificidade associada ao desenvolvimento de métodos de coleta menos invasivos, abriram caminho para um diagnóstico mais eficiente e uma maior compreensão da infecção por *Leishmania* spp. Com isso, os métodos moleculares aparecem como novo "padrão de ouro" para o diagnóstico de LC (Weigle *et al*, 2002), e torna-se especialmente importante para a doença que apresenta uma baixa carga parasitária, como na LM (Bracho *et al*, 2007). Além disso, o desenvolvimento de técnicas rápidas e não invasivas para o diagnóstico de leishmaniose recidivante é uma necessidade crescente na medicina atual.

A utilização de swab associado à biologia molecular para o diagnóstico da leishmaniose primária foi descrita por Boggild *et al* (2011a) e demonstrou resultados satisfatórios. Vários estudos têm-se concentrado na utilidade de PCR no diagnóstico de LC e LM primárias (Safaei *et al*, 2002; Goto e Lindoso, 2010; Neitzke-Abreu *et al*, 2013; Paiva-Cavalcanti *et al*, 2015), mas pouca pesquisa foi feita em sua aplicabilidade em pacientes já tratados e com potencial de desenvolver recidiva da doença. Desta forma, avaliamos a eficácia de método diagnóstico não invasivo – utilização de swab - para LTA através de técnicas de PCR utilizando os iniciadores para os genes alvos *kDNA* e *Hsp70* e também realização de qPCR para o gene alvo *Hsp70* em amostras de pacientes com lesão primária ativa, pacientes já tratados para leishmaniose que faziam controle pós-cura da doença para avaliação de resposta terapêutica e detecção de possível recidiva e pacientes com LTA que tinham mucosa nasal íntegra a fim de avaliar um diagnóstico precoce de LM.

A técnica não invasiva utilizada para obtenção das amostras cutâneas e mucosas foi eficaz para a recuperação de DNA, demonstrando alto grau de pureza dos mesmos, além de PCRs sem inibidores comprovado pela positividade da análise para o gene da β -globina humana. Ainda assim, a maior dificuldade encontrada nesta pesquisa foi a baixa concentração de DNA recuperada do swab, entretanto este tipo de coleta mostrou ser de grande validade, por ser indolor, de fácil execução, sem a necessidade de pessoal treinado, poder ser feita em qualquer local e, ao contrário dos métodos invasivos como a biópsia de tecido, a coleta por swab minimiza o risco de infecções iatrogênicas que possam comprometer o diagnóstico e recuperação do paciente (Rodrigues *et al*, 2002)

O desempenho dos testes de amostras de lesão ativa da doença colhidas por swab foram compatíveis ao de PCR de amostras de biópsia e superior a qualquer diagnóstico de rotina para leishmaniose tegumentar analisado em pacientes com lesões ativas de LTA. Estes resultados corroboram com dados encontrados por Boggild *et al*. (2011a) e por Ferreira *et al* (2013) que analisaram a utilização de swab para coleta de amostras de pacientes humanos e cães, respectivamente, com suspeita de LM e LV, e por Mimori *et al* (2002) que encontraram sensibilidade de 93,8% na detecção de cinco espécies de *Leishmania* spp. através de PCR em amostras de swab de pacientes com LC.

A utilização do primer kDNA para detecção de *Leishmania* spp. é uma questão muito debatida (Pizzuto *et al*, 2001; Volpini *et al*, 2004; Garcia *et al*, 2005; Garcia *et al*, 2007a; Goto e Lindoso, 2010; Martins *et al*, 2010; Boggild *et al*, 2011a). Os resultados apresentados demonstram que a alta eficiência de

detecção do parasita a partir da aplicação de PCR com o iniciador kDNA em amostras coletadas com swab fornece acesso não invasivo dos tecidos e apresenta-se como uma promissora alternativa de diagnóstico para biópsia e avaliação histopatológica, tanto em pacientes com LM como com LC. Resultados similares foram encontrados por Figueroa *et al* (2009) em pacientes com LM reforçando o bom desempenho no teste.

O uso de kDNA como alvo de amplificação em amostras coletadas através de swab demonstrou resultados favoráveis devido a sua abundância no DNA de *Leishmania* spp., cerca de 10.000 cópias por célula (Mouttaki *et al*, 2014). Entretanto, resultados falso-positivos tornam-se uma preocupação em decorrência das reações extremamente sensíveis (Volpini *et al*, 2004), principalmente por que utilizou-se primers degenerados. Por outro lado, Martins *et al* (2010) relaram em seu trabalho o encontro de PCR de biópsias positiva para detecção de DNA de *L. braziliensis* em indivíduos considerados clinicamente curados há mais de dez anos e Mendonça *et al* (2004) identificaram DNA de *L. braziliensis*, utilizando a PCR em três pacientes considerados curados há seis anos.

Quando analisamos a mucosa nasal íntegra de pacientes com lesão ativa ou já tratados de LC ou LM (sem histórico de lesão nas narinas) para detecção precoce de LM, obtivemos alta positividade (86%) utilizando o iniciador kDNA. Resultado semelhante foi relatado por Figueroa *et al*, (2009) na Bolívia, que encontraram positividade de 81% para este iniciador em mucosas íntegras. Boaventura *et al* (2006) encontraram lesões na mucosa de pacientes com lesões cutâneas a menos de 30 dias concomitantemente, o que reforça a importância da detecção precoce de LM devido ao impacto social que esta

enfermidade pode causar (Al-Qahtani *et al*, 2012). A presença de *Leishmania* em tecidos mucosos na aparente ausência de patologia sugere que a metástase e a presença de parasitas em tecidos mucosos por si só não explica a patogênese da LM e apoia a ideia de que a resposta do hospedeiro desempenha um papel importante na patogênese da doença mucosa (Blackwell, 1999; Bacellar *et al*, 2002). Ressaltamos que no momento da triagem dos pacientes que faziam controle pós-tratamento da doença, todos encontravam-se sem sinais clínicos de recidiva da doença. Apesar da positividade de DNA do parasito sem sintomatologia poder refletir o contato prévio com o protozoário e não necessariamente envolver o aparecimento de sintomas específicos, Prina *et al* (2007) demonstraram que o DNA de *Leishmania* é rapidamente degradado após a morte do parasita, assim a sua identificação no tecido mucoso poderia ser indicativo da presença de parasitos viáveis e com potencial de recidiva da moléstia, reforçando a importância de fazer o acompanhamento destes pacientes pós-cura clínica por períodos prolongados. Outros estudos têm mostrado a persistência do parasito viável após o tratamento clínico, durante as diferentes fases de tratamento (Guevara *et al*, 1994), e no sangue de um paciente 30 anos após a infecção inicial e nos quais a lesão tinha curado espontaneamente (Guevara *et al*, 1993). Uma avaliação mais específica para detecção de parasito em mucosa íntegra pós-tratamento seria a detecção de RNA mensageiro do parasito, o que não foi feito nesta análise, o qual poderia confirmar a presença de parasito viável.

Das amostras analisadas, 97,26% foram caracterizadas como *L. (V.) braziliensis* através de padrão de clivagem com enzima *HaeIII*, resultado este já esperado considerando que os pacientes eram provenientes de área de

transmissão desta espécie e que esta é a principal causadora de LM no Brasil (Brasil 2007). Entretanto, duas amostras positivas de pacientes já tratados não foram características para esta espécie, fato este que pode ser explicado pelo aumento de relatos de lesões mucosas (com ou sem LC concomitante) causadas por *L. infantum* / *L. donovani*, *L. major* e *L. tropica* (Strazzulla *et al*, 2013) ou *L. guyanensis* (Guerra *et al*, 2011).

A aplicação do iniciador Hsp70 nas amostras de swab demonstrou a ocorrência de resultados falso-negativos comprovando sua baixa sensibilidade em amostras de lesões ativas. Resultados similares foram encontrados em pacientes que faziam controle pós-tratamento de LTA e naqueles que buscamos parasitos na mucosa nasal íntegra. Os resultados errôneos para leishmaniose ativa foram comprovados por testes de rotina e molecular utilizando outros iniciadores e amostras de biópsia. Encontrou-se, também, diferença na eficácia deste teste em pacientes com LM e com LC, tendo melhor aplicação em pacientes com LC. Este resultado pode ser explicado devido a maior quantidade de parasito encontrado em lesões de pele comparado as lesões mucosas. Apesar dos baixos índices encontrados neste estudo, o estabelecimento de protocolos utilizando alterações nas bases nitrogenadas da sequência de codificação para o *Hsp70* e em diferentes tempos de Melting, permite a diferenciação de espécies de *Leishmania* em ensaios moleculares de amostras de biópsia (Zampieri *et al*, 2016), fato que proporciona um tratamento rápido e eficaz para a doença. Outro ponto que pode estar relacionado com a menor sensibilidade do alvo Hsp70 deve-se ao fato de que este gene encontra-se em menor número no parasito (Ramirez *et al*, 2011).

A escassez de parasitas na lesão destrutiva da mucosa (Lessa *et al*, 2001) associado a variabilidade na quantidade de material biológico coletado através de swab torna necessário maiores estudos da aplicação do gene *Hsp70* como alvo para detecção precoce de LM, bem como na recidiva, porém estudos anteriores já demonstraram alta sensibilidade deste gene alvo em amostras colhidas por biopsia (Fraga *et al*, 2012). Nota-se que as reações de amplificação por PCR utilizando os iniciadores para kDNA apresentaram índices de positividade maiores, enquanto que as reações utilizando os iniciadores para *Hsp70* apresentaram índices menor, indicando, por este critério, que as reações de PCR-kDNA seriam mais sensíveis para amostras de mucosa coletas com swab, devido a maior quantidade de cópias deste gene que do gene *Hsp70*.

Quando comparado à utilização do *Hsp70* em amostras de swab e de biópsia pôde-se perceber resultados mais sensíveis na segunda amostra e, principalmente naquelas provenientes de pacientes com suspeita de LC. Este fato pode ser explicado pela dificuldade de recuperação do DNA de swab e por este gene ser cópia única do DNA de *Leishmania* (Folgueira *et al*, 2005) sendo mais detectável nas amostras de biópsia, onde há maior quantidade de parasito e conseqüentemente de DNA do mesmo.

Ao analisar a utilização de qPCR tendo como alvo sequências do gene *Hsp70* notou-se uma baixa eficiência do teste, tanto em amostras de swab como as de biópsia. Apesar desses resultados, a qPCR de biópsia ainda mostrou-se superior a do swab. As análises de amostras de swab deste estudo demonstraram que a PCR convencional teve melhores resultados do que a qPCR utilizando mesmo iniciador. Em discordância dos resultados

obtidos, Adams et al. (2014) comprovaram a boa aplicabilidade e precisão da qPCR em amostras de lesões de pacientes com LC coletadas através de swab quando o alvo utilizado é o gene *18S rDNA*, encontrando sensibilidade e especificidade de 98% e 84%, respectivamente, para o teste. Um fato que poderia explicar os resultados diferentes com gene alvo *Hsp70* quando utilizado o PCR convencional e o PCR em tempo real, poderia estar relacionado ao desenho dos primers, os quais seriam mais indicados para uso na PCR convencional do que para qPCR.

Não houve diferença significativa na comparação dos três testes em relação às formas da doença ativa e de coleta. Entretanto, ficou evidente que para o material coletado com swab, o teste PCR-kDNA é superior aos indicadores PCR-Hsp70 e qPCR-Hsp70, assim como em amostras de biópsia os indicadores PCR-kDNA e PCR-Hsp70 demonstraram resultados melhores que os obtidos com qPCR. A diferença encontrada na efetividade dos testes neste estudo corrobora com resultados apresentados por Koltas *et al* (2016) que verificaram que o kDNA-PCR é o iniciador de maior sensibilidade para diagnóstico de rotina de LTA quando comparados com os iniciadores SSU rRNA-PCR, ITS2-PCR, ITS1-PCR, ME-PCR e Hsp70-PCR, enquanto o Hsp70-PCR foi o pior avaliado.

A boa concordância encontrada em nosso estudo com os testes convencionais; pesquisa direta do parasito, reação de Montenegro e ELISA são corroboradas pelos resultados encontrados por Espir *et al* (2016). Encontramos baixa concordância de nossas reações com o exame histopatológico, este exame geralmente detecta lesões inflamatórias de LC e LM consistentemente, mas nem sempre distingue de outros processos inflamatórios, principalmente

da esporotricose (Weigle *et al*, 2002). O exame histopatológico é mais útil no diagnóstico de doenças não-leishmanioses devido a sua baixa utilidade em relação ao custo no diagnóstico da LT.

De acordo com nosso estudo, amostras cutâneas e mucosas coletadas através de swab apresentaram elevado potencial de diagnóstico molecular de LTA usando PCR devido seus altos índices positivos, que eram equivalentes as amostras obtidas a partir de biópsia utilizando mesmo iniciador. O uso de swab tem várias aplicações no diagnóstico molecular de leishmaniose humana e canina (Ferreira *et al*, 2013). Além disso, a coleta de amostras orais através de swab já foi utilizada com sucesso para detectar a infecção de LV em pacientes na Índia (Vaish *et al*, 2011). Estes achados estendem o potencial desta amostra clínica para diagnóstico molecular das leishmanioses.

Este estudo demonstra que a coleta de amostra clínica feita através de procedimento não invasivo seguida da técnica de PCR para diagnóstico de leishmaniose é satisfatória, embora mais estudos devam ser realizados e a utilização de outros iniciadores avaliados. Foi demonstrado ainda que utilizando o iniciador kDNA esta metodologia demonstra maior eficácia comparada com o iniciador Hsp70 e a técnica qPCR. A coleta de amostras clínicas com swab oferece inúmeras vantagens sobre a biópsia, como o custo reduzido, o conforto e segurança do paciente e a facilidade do procedimento, o que diminui a necessidade de pessoal altamente treinado para coletar a amostra.

Os fatores desencadeantes para a reativação da leishmaniose em pacientes clinicamente curados ainda são obscuros, entretanto a imunossupressão tem se mostrado sendo um destes fatores (Ferreira e Borges, 2002) através de relatos de reativação da infecção após iniciação de

drogas imunossupressoras, tais como anti-TNF- α (Hakimi *et al*, 2010; Romero-Mate *et al*, 2012; Neumayr *et al*, 2013) e esteroides (Tuon *et al*, 2007; Hernandez-Torres *et al*, 2013). Outro fator que vem sendo analisado é a co-infecção de *L. (V.) braziliensis* e helmintos, gerando um período mais longo para a cura e o triplo de frequência de falha terapêutica e de recidiva da moléstia (O'neal *et al*, 2007; Azeredo-Coutinho *et al*, 2016).

Muitos autores têm sugerido o uso da biologia molecular como abordagem de monitorização terapêutica. Os dados apresentados neste estudo sugerem que a aplicação prática de um ensaio de PCR de amostras de mucosa coletas através de swab para monitorização terapêutica de LM pode ser utilizado fornecendo informações adicionais valiosas para casos de falhas terapêuticas e recidivas da moléstia. Além disso, a PCR-kDNA demonstrou ser uma ferramenta muito importante na detecção de DNA de *Leishmania* em mucosa após o tratamento, porém isoladamente não deve ser utilizada como preditor de recidiva ou falha terapêutica, visto que após o tratamento mesmo com a detecção de DNA de *Leishmania* não foram observadas alterações clínicas sugestivas de doença em atividade.

Um dado interessante é detecção de DNA pela PCR-Hsp70 nesta população. O gene hsp codifica as proteínas classificadas como choque térmico (heat-shock), que desempenham um papel importante no dobramento, montagem, localização intracelular, secreção, regulação, estabilização e degradação de outras proteínas (Young *et al*, 2004). Uma delas, a proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) tem sequência e função altamente conservadas em procariotos e eucariotos, demonstrando grande importância como molécula chaperona no transporte e dobramento de proteínas. A

detecção de DNA do gene Hsp70 em pacientes após o tratamento, mesmo que sem lesão em atividade poderia ser um indicativo de que o parasito estaria se replicando e, portanto com risco mais elevado de ocorrer recidiva. Entretanto maiores estudos para comparação de sua utilização para este fim devam ser realizados.

A dificuldade da detecção e identificação do parasito na mucosa através de testes convencionais devido a baixa concentração de protozoários nas lesões (Gul *et al*, 2013) pode levar a demora do diagnóstico e a progressão destrutiva do tecido da mucosa e cartilagem. Neste sentido, a PCR torna-se um método fácil e eficiente para diagnóstico de LM. Conseguimos demonstrar a presença de *Leishmania* nos tecidos da mucosa aparentemente saudável de pacientes com LC ou LM sem lesão nasal. Os dados encontrados por nós, por Vergel *et al* (2005) e Vergel *et al* (2006) sugerem que a disseminação do parasito para a mucosa nasal pode ser uma característica comum na LC causada por espécies de *Leishmania* (*Viannia*) (Figueroa *et al*, 2009), pois a disseminação hematológica destes parasitos para a mucosa a partir de um foco cutâneo já está bem estabelecida (Conter *et al*, 2015; Vergel *et al*, 2006).

A coleta de amostras a partir do swab nos permitiu analisar tecidos sem lesão sem causar danos ao paciente, demonstrando a presença de DNA de *Leishmania* mesmo antes de alterações teciduais aparecerem. Estes dados podem referenciar uma detecção precoce de LM, porém mais estudos devem ser realizados para a confirmação desta hipótese. Independentemente de alterações ou lesões na mucosa, pacientes já tratados de leishmaniose ou com leishmaniose cutânea ativa que tiverem kDNA detectados em sua mucosa, deveriam ficar sob vigilância até a obtenção de mais dados sobre a doença.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitiram as seguintes conclusões:

1. A comparação da especificidade e sensibilidade de resultado de diagnóstico molecular entre amostras coletadas através de biópsia e de swab revelou elevado índice de concordância, apresentando-se equivalentes entre si. Portanto, o método de coleta através do swab apresentou-se eficaz para o diagnóstico molecular da LTA em vários tipos de lesões, e demonstra potencial de aplicação no diagnóstico da doença em serviços de saúde.
2. Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, a utilização do iniciador kDNA mostrou-se mais eficaz quando comparada com iniciador Hsp70 na PCR convencional e na qPCR em amostras coletadas por swab.
3. A coleta de amostras de mucosa nasal íntegra de pacientes com LC ativa ou tratada permitiu detectar a presença de *Leishmania* nos tecidos da mucosa aparentemente saudável de pacientes. Devido à coleta com swab, foi possível analisar amostras sem lesão, sem causar danos ao paciente, demonstrando a presença de *Leishmania* mesmo antes de alterações teciduais aparecerem.

4. A aplicação de biologia molecular de amostras de mucosa coletadas através de swab para monitorização terapêutica de LM pode ser utilizado fornecendo informações adicionais valiosas para casos de falhas terapêuticas e recidivas da moléstia. Além disso, a PCR-kDNA demonstrou ser uma ferramenta muito importante no acompanhamento de recidiva da doença. Entretanto a PCR-Hsp70 necessita de maiores estudos para comparação de sua utilização para este fim.

8. REFERÊNCIAS

Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HD. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82:591–6.

Adams ER, Gomez MA, Scheske L, Rios R, Marquez R, Cossio A, Albertini A, Schallig H, Saraiva NG. Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitol.* 2014;141:1891–7.

Al-Jawabreh A, Schnur L, Nasereddin A, Schwenkenbecher J, Abdeen Z, Barghuthy F, Khanfar H, Presber W, Schönián G. The recent emergence of *Leishmania tropica* in Jericho (A'riha) and its environs, a classical focus of *L. major*. *Trop Med Int Health.* 2004;9:812-6.

Al-Qahtani MS, Malik NW, Jamil S, Mekki TE. Diagnostic dilemma of primary mucosal leishmaniasis. *Saudi Med J.* 2012;33:1234–8.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; WHO. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One.* 2012;7:e35671.

Alves R, Viana I, Vale E, Bordalo O. Biópsia cutânea: onde, quando e como? *Med Cutan Iber Lat Am.* 2011;39:3-12.

Amato VS, Duarte MIS, Nicodemo AC, Carvalho LV, Pagliari C, Matta VLR, Oliveira LS, Castro SM, Uip DE, Amato JGP, Amato Neto V. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1998;40:23-30.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Amato Neto V. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77:266-74.

Andrade BB, Boaventura V, Barral-Neto M, Barral A. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, falácias e perspectivas. *Gaz Med Bahia.* 2005;75:75-82.

Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 2007;195:1846–51.

Araújo AIF. Avaliação do método de coleta através do swab para o diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes de áreas endêmicas de Pernambuco, Brasil. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco.

Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000;30:1269-80.

Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol.* 1999;85:181–7.

Azeredo-Coutinho RB, Pimentel MI, Zanini GM, Madeira MF, Cataldo JI, Schubach AO, Quintella LP, de Mello CX, Mendonça SC. Intestinal helminth coinfection is associated with mucosal lesions and poor response to therapy in American tegumentar. *Acta Trop.* 2016;154:42–9.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro De Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002;70:6734-40.

Barker DC, Butcher J. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77:285-97.

Barral A, Costa JML. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. Fiocruz, 1a ed., 2011, p.137-145.

Barral-Netto M, Brodskyn C, Carvalho EM, Barral A. Human-leishmaniasis@cytokines.bahia.br. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31:149-55.

Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E.. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:102–9.

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. *J Cutan Pathol*. 2003;30:616-20.

Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert Opin Biol Ther*. 2003;3:875-85.

Berrahal F, Mary C , Roze M , Berenger A , Escoffier K , Lamouroux D, Dunan S. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55:273-7.

Bermudez H, Rojas E, Garcia L, Desjeux P, Dujardin JC, Boelaert M, Chappuis F. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100:591–600.

Blackwell JM. Tumour necrosis factor alpha and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasitol Today*. 1999;15:73–5.

Boaventura VS, Café V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, Freitas LAR, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. Short report: concomitant early mucosal and cutaneous Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:267–9.

Boggild AK, Valencia BM, Espinosa DE, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Low DE. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 2010;50:e1-6.

Boggild AK, Valencia BM, Veland N, Ramos AP, Calderon F, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A. Non-Invasive Cytology Brush PCR Diagnostic Testing in Mucosal Leishmaniasis: Superior Performance to Conventional Biopsy with Histopathology. *Plos one*. 2011a;6:e1-6.

Boggild AK, Ramos AP, Valencia BM, Veland N, Calderon F, Arevalo J, Low DE, Llanos-Cuentas A. Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2011b;49:1097–100.

Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1996;84:188-94.

Bracho CO, Quintana LP, Arenas SM, Parra MR. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:549–54.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2a ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2a ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2010.

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Orientações sobre a utilização da Anfotericina B para o tratamento de pacientes com as leishmanioses. Brasília, 2011a. (Nota técnica nº 52, de 21 de outubro de 2011).

Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com coinfeção Leishmania/HIV. Brasília, 2011b.

Brasil, Ministério da Saúde. 2016. Portal da Saúde SUS. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>> Acesso em 28 de maio de 2016.

Calvopina M, Uezato H, Gomez EA, Korenaga M, Nonaka S, Hashiguchi Y. Leishmaniasis recidiva cutis due to Leishmania (Viannia) panamensis in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. Int J Dermatol. 2006;45:116–20.

Carvalho LP, Passos ST, Jesus AR. Immunopathogenesis of Tegumentary Leishmaniasis. Gaz Med Bahia. 2005;75:57-65.

Carvalho ML, Andrade AS, Fontes CJ. Leishmania (Viannia) braziliensis is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. Acta Trop. 2006;98:277-85.

Carvalho LMV. Comparação de parâmetros clínicos, laboratoriais e de imunidade celular entre a leishmaniose tegumentar americana com apresentação clínica esporotricóide e a forma de apresentação típica da doença. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Clínicas em Doenças Infecciosas). Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol. 2003;41:540–6.

Condino MLF, Galati EAB, Holcman MM, Salum MRB, Silva DC, Novaes JRA. Leishmaniose tegumentar americana no Litoral Norte Paulista, período 1993 a 2005. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41:635-41.

Conter CC, Neitzke-Abreu HC, Pedroso RB, Lonardoni MVC, Silveira TGV. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) DNA in leucocytes from the blood of patients with cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48:626-8.

Corvalan FH, Sampaio RNR, Brustoloni YM, Andreotti R, Lima Júnior MSC. DNA identification of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in human saliva from a patient with American cutaneous leishmaniasis. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2011;17:98-102.

Costa JML, Cunha AK, Gama MEA, Saldanha ACR. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil: revisão. An Bras Dermatol. 1998;73:565-76.

Costa JM, Durand R, Deniau M, Rivollet D, Izri M, Houin R, Vidaud M, Bretagne S. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol. 1996;34:1831–3.

Costa AC, Toledo VPCP, Genaro O, Williams P, Mayrink W. Montenegro skin test - evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. Mem Inst Oswald Cruz. 1996;91:193-4.

Costa, JML. Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar. In: Barral, A; Costa, JML. Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas. 1a ed. Salvador: Contexto, 2011, cap. 13, p. 137-145.

Courret N, Lang T, Milon G, Antoine JC. 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. 2003;33:1373-83.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev. 2006;19:111–26.

Cuba-Cuba CA, Marsden PD, Barretto AC, Jones TC, Richards F. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed-hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 1985;18:231-6.

Das S, Halder A, Rabidas VN, Mandal A, Das P. Specific Noninvasive Detection of *Leishmania donovani* in Desquamated Buccal Cell Swab Samples from Human Visceral Leishmaniasis-HIV Coinfected Patients. J Clin Microbiol. 2014;52:1238–41.

Das Gupta S, Ghosh DK, Majumder HK. A cloned kinetoplast DNA minicircle fragment from *Leishmania* spp: specific for post kala-azar dermal leishmaniasis strains. Parasitol. 1991;102:187-91.

David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Fern Ther. 2009;22:491-502.

De Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CB, Correa T, Freitas LA, Nascimento E, Costa JM, Barral A. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis. 2003;37:e149-53.

Delgado D, Guevara P, Silva S, Belfort E, Ramirez JL. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.*1996;55:267-72.

Delgado J, Pineda JA, Regordan JMC, Gallardo JA, Leal M, Sanchez-Quijano A, Lissen E. Low sensitivity of peripheral blood smear for diagnosis of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J Clin Microbiol.* 1998;36:315–6.

Espinosa D, Boggild AK, Deborggraeve S, Laurent T, Valencia C, Pacheco R, Miranda-Verastegui C, Llanos-Cuentas A, Leclipteux T, Dujardin JC, Buscher P, Arevalo J. *Leishmania* OligoC-Test as a simple, rapid, and standardized tool for molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Peru. *J Clin Microbiol.* 2009;47:2560–3.

Espir TT, Guerreiro TSA, Naiff MF, Figueira LP, Soares FV, Silva SS, Franco AMR. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol.* 2016;167:1e6.

Faber WR, Oskam L, Van Gool T, Kroon NC, Kneegt-Junk KJ, Hofwegen H, Van Der WAL Ac, Kager PA. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 2003;49:70–4.

Fernandes O, Catanho MP, Segura I, Labrada LA, Derré R, Saravia N, Degrave W. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. *J Parasitol.* 1999;85:563-8.

Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infection in immunocompromited patients: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97:443-57.

Ferreira AS, Ituassu LT, de Melo MN, de Andrade AS. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2008;152:257-63.

Ferreira AS, Almeida GG, Silva SO, Vogas GP, Fujiwara RT, de Andrade AS, Melo MN. Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of *Leishmania infantum* DNA. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2150.

Figuerola RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, Diaz YR, Tellez JA, Saravia NG. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Vianna)* species. *J Infect Dis.* 2009;200:638-46.

Folgueira C, Quijada L, Soto M, Abanades DR, Alonso C, Requena JM. The translational efficiencies of the two *Leishmania infantum* HSP70 mRNAs, differing in their 3'-untranslated regions, are affected by shifts in the temperature of growth through different mechanisms. *J Biol Chem.* 2005;280:35172-83.

Fisa, R. Riera C, Gállego M, Manubens J, Portús M. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. *Vet Parasitol.* 2001;99:105-11.

Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol.* 2010;10:238–45.

Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild AK, Valencia BM, Arévalo J, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Auwera GV. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:142-50.

Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodríguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, Ferrer L, Sánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for di-

agnosis and monitoring of canine leishmaniosis. Vet Parasitol. 2006;137:214-21.

Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, Rosales E, Tovar AA, Lucas CM, Llanos-Cuentas A, Berman JD. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis, Ann Intern Med. 1990;113:934–40.

Furtado T. Critérios para diagnóstico de LTA. An Bras Dermat, 1980;65:51-86.

Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, LE Ray D, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. Infect Genet Evol. 2005;5:109–16.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Quispe-Tintaya KW, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J Clin Microbiol. 2004;42:2294–7.

Garcia AL, Tellez T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H, Dujardin JC. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2007a;101:1208–13.

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

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36:71-80.

Ghosn SH, Kurban AK. Leishmaniasis and other protozoan infections In: Wolff K, et al., editores. Fitzpatrick's dermatology in general medicine. 7a ed, Nova lorque : McGraw Hill; 2008. v. 11, p. 2001-2009.

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

Gramiccia M, Smith DF, Angelici MC, Ready PD, Gradoni L. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitol.* 1992;105:29-34.

Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005;35:1169-80.

Grimaldi G JR, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implication for the future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6:230-50.

Guarín N, Palma GI, Primez C, Valderrama L, Tovar R, Saraiva NG. Comparative immunohistological analysis of the Montenegro skin test reaction in asymptomatic infection and in acute and chronic cutaneous leishmaniasis. *Biomedica.* 2006;26:38-48.

Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LC. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e980.

Guerra JAO, Barbosa MGV, Oureiro ACSPO, Coelho CP, Rosa GG, Coelho LIACR. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2007;23:2215-23.

Guevara P, Ramírez JL, Rojas E, Scorza JV, González N, Añez N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet.* 1993;341:1341.

Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza JV, Añez N, Valera M, Ramírez JL. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994;1:385-9.

Gul HC, Tosun F, Karakas A, Koru O, Onguru O, Mert G, Besirbellioglu BA, Eyigun CP. A case of mucosal leishmaniasis: Mimicking intranasal tumor with perforation of septum. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013; xx:1-4.

Hakimi S, Riviere S, DEL Giudice P, Dereure J, Le Quellec A. Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a patient treated with infliximab. *Dermatol.* 2010;220:63-5.

Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4, and interleukin-10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88:7011-5.

Hernandez-Torres A, Garcia-Vazquez E, Frias-Iniesta J, Herrero-Martinez JA, Gomez-Gomez J. Cutaneous leishmaniasis in a patient receiving infliximab. *Scand J Infect Dis.* 2013;45:567–9.

Hommel M, Peters W, Ranque J, Quilici M, Lanotte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1978;72:213-218.

Hu RV, Kent AD, Adams ER, Van Der Veer C, Sabajo LO, Mans DR, De Vries HJ, Schallig HD, Lai AFRF. First case of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Suriname. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86:825–7.

Jara M, Adaui V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van Der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Arevalo J. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1826–33.

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

Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, Alabaz D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2016;164:43-8.

Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol*. 2002;40:210-5.

Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis the Neotropical *Leishmania* species. In: Feg C, Kreier JP, Wakelin D, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 9a ed. London: 1998. v. 5, p. 242-266.

Laskay T, Diefenbach A, Rollinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*. 1995;25:2220–7.

Launois P, Louis JA, Milon G. The fate and persistence of *Leishmania major* in mice of different genetic backgrounds: an example of exploitation of the immune system by intracellular parasites. *Parasitol*. 1997;115:25-32.

Leite RS, Mendes VC, Ferreira ALC, Andrade ASR. The use of conjunctival swab samples for PCR screening for visceral leishmaniasis in vaccinated dogs. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2011;20:36-41.

Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Guerreiro JB, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with Pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:87–9.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol*. 2007;73:843-7.

Lima EB, Porto C, Motta JOC, Sampaio RNR. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. An Bras Dermatol. 2007;82:111-24.

Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. Lancet. 1984;2:295.

Manocha D, Bansal N, Farah RS. Types and Selection Criteria for Various Skin Biopsy Procedures. In: Khopkar U, editor. Skin Biopsy – Perspectives. Rijeka: InTech. 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-perspectives/types-and-selection-criteria-for-various-skin-biopsy-procedures>> Acesso em: 10 jun 2016.

Manson-Barh PE. Diagnosis. In: The Leishmaniasis, Editado por R. PWK-K. Londres, 1987, p. 703-728.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). Trans Rev Soc Trop Med Hyg. 1986;80:859-76.

Martins L, Alexandrino A, Guimarães G. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes de Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Saúde Pública. 2010;44:1-4.

Marzochi MC. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. J Bras Med. 1992;63):82-104.

Matsumoto T, Hashiguchi Y, Gomez EA, Calvopina MH, Nonaka S, Saya H, Mimori T. Comparison of PCR results using scrape/exudate, syringe-sucked fluid and biopsy samples for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1999;93:606–7.

Mendonça SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1988;83:347-55.

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

Menzel S, Bienzel V. Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the world. *Tropenmed Parasitol.* 1978;29:194-7.

Mimori T, Matsumoto T, Calvopina MH, Gomez EA, Saya H, Katakura K, Nonaka S, Shamsuzzaman SM, Hashiguchi Y. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop.* 2002;81:197–202.

Miranda A, Saldana A, Gonzalez K, Paz H, Santamaria G, Samudio F, Calzada JE. Evaluation of PCR for cutaneous leishmaniasis diagnosis and species identification using filter paper samples in Panama, Central America. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106:544–8.

Modabber F, Buffet PA, Torreele E, Milon G, Croft SL. Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2007;6:3.

Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, Montano I, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitol.* 2010;137:1159–68.

Mouttaki T, Morales-Yuste M, Merino-Espinosa G, Chiheb S, Fellah H, Martin-Sanchez J, Riyad M. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. *Parasit Vectors.* 2014;7:420.

Myler PJ, Fasel N. *Leishmaniasis: epidemiological trends and diagnosis.* Norfolk: Caister Academic Press. 2008. *Leishmania after the genome*; p. 1-14.

Neitzke-Abreu HC, Venazzi MS, Bernal MV, Reinhold-Castro KR, Vagetti F, Mota CA, Silva NR, Aristides SM, Silveira TG, Lonardoni MV. Detection of DNA from *Leishmania* (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*. 2013;8:e62473.

Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Barreto AC, Badaro R, Johnson WD, Jones TC. Long-term follow-up of patients with *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* infection and treated with glucantime *Trans R. Soc Trop Med Hyg*. 1990;84:367–70.

Neumayr AL, Morizot G, Visser LG, Lockwood DN, Beck BR, Schneider S, Bellaud G, Cordoliani F, Foulet F, Laffitte EA, Buffet P, Blum JA. Clinical aspects and management of cutaneous leishmaniasis in rheumatoid patients treated with TNF-alpha antagonists. *Travel Med Infect Dis.*, 2013;11:412–20.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg*. 1997;57:651–5.

O'neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, Passos S, Glesby MJ, Carvalho EM. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007;195:142–8.

Organização Mundial da Saúde, 2010. Control of the Leishmaniasis. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>

Organização Mundial da Saúde, 2015. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Disponível em <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1>

Organização Mundial da Saúde, 2016. Disponível em <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/>.

Organização Pan-Americana de Saúde / Organização Mundial da Saúde. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. WHO Report Leishmaniasis nº 3 July 949. 2015.

Paiva-Cavalcanti M, De Moraes RC, Pessoa-E-Silva R, Trajano-Silva LA, Gonçalves-De-Albuquerque SDAC, Tavares DDEH, Brelaz-De-Castro MC, Silva RDEF, Pereira VR. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. Cell Biosci. 2015;5:31.

Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. Am J Trop Med Hyg. 2001;64:187–93.

Passi D, Sharma S, Dutta S, Gupta C. Localised leishmaniasis of oral mucosa: Report of an unusual clinopathological entity. Case Rep Dent. 2014;2014:1-5.

Pennisi MG, Reale S, Giudice SL, Masucci M, Caracappa S, Vitale M, Vitale F. Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. Vet Res Commun. 2005;29:301-3.

Pereira VF, Benassi JC, Starke-Buzetti WA, Silva DT, Ferreira HL, Keid LB, Soares RM, Ruiz VLA, Oliveira TMFS. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49:104-6.

Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CR, Britto C, Rangel EF. First report of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) naturally infected by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in a periurban area of

South Brazil using a multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:593-5.

Pizzuto M, Piazza M, Senese D, Scallamogna C, Calattini S, Corsico L, Persico T, Adriani B, Magni C, Guaraldi G, Gaiera G, Ludovisi A, Gramiccia M, Gali M, Moroni M, Corbellino M, Antinori S. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol.* 2001;39:357–61.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* 2007;9:1307–15.

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

Ramirez CA, Requena JM, Puerta CJ. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasit Vectors.* 2011;4:166.

Ranasinghe S, Rogers ME, Hamilton JG, Bates PA, Maingon RD. A real time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102:875-82.

Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;109:937-54.

Ray DS. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. *Plasmid.* 1987;17:177-90.

Ready PD. Biology of Phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu Rev Entomol.* 2013;58:227–50.

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

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol.* 2007;45:21-5.

Rey L. *Leishmania* e leishmaníases: os parasitos. *Parasitologia.* 3a ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001, p. 214-226.

Rey L. *Parasitologia.* 4ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2008, p.930.

Ribeiro FC, Schubach AO, Mouta-Confort E, Schubach TMP, Madeira MF, Marzochi MCA. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet Parasitol.* 2007;148:200-6.

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31:143-8.

Rodrigues EHG. Validação de abordagens moleculares para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco. 2000. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2000.

Rodrigues EHG, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militão de Albuquerque Mde F, Jardim ML, Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in Northeastern Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002;40:3572-6.

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

Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J. Leishmania infection: laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard”. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(2):251–6.

Rodríguez-González I, Marín C, Vargas F, Córdova O, Barrera M, Gutiérrez-Sánchez R, Alunda JM, Sánchez-Moreno M. Identification and biochemical characterization of *Leishmania* strains isolated in Peru, Mexico, and Spain. *Exp Parasitol.* 2006;112:44-51.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L.(V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;65:456–65.

Romero-Mate A, Martinez-Sanchez D, Tardio JC, Moreno-Torres A, García-Donoso C, Aguado-Lobo M, Espinosa-Lara P, Borbujo J. Cutaneous leishmaniasis with histopathologic pattern of non-necrotizing granulomatous dermatitis in patients treated with adalimumab. *Dermatol Online J.* 2012;18:7.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:845-58.

Safaei A, Motazedian MH, Vasei M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. *Dermatol.* 2002;205:18-24.

Saraiva NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:86–94.

Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha, MC, Oyafuso LK, Soler RC, Co-trim PC, Lindoso, JAL. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2013;55:393-9.

Schonian G, Schweynoch C, Zlateva K, Oskam L, Kroon N, Graser Y, Presber W. Identification and determination of the relationships of species and strains within the genus *Leishmania* using single primers in the polymerase chain reaction. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1996;77:19–29.

Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceicao-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB. Cutaneous scars in american tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:824-7.

Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans Rev Soc Trop Med*. 1975;69:323-35.

Silva LA, Sousa CS, Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the Hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2010;10:77–83.

Silveira FT, Duarte ERL, De-Farias ECF, Ikeda CS, Lopes AP, Chagas EJP, Teixeira LM, Ishikawa EA. Leishmaniose mucosa na Amazônia brasileira: Avaliação, retrospectiva, dos Aspectos Clínicos e epidemiológicos da Doença, com ênfase ao Estado do Pará. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32:9-20.

Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, Werneck SM, Camargo ZP, Ono MA. Serological detection of antibodies against *Para-*

coccidioides brasiliensis in dogs with leishmaniasis. *Mycopathol.* 2006;162:325-9.

Singh S. New developments diagnosis of Leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123:311-30.

Sjölander A, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J Immunol.* 1998;160:3949-57.

Souza LW, Souza SV, Botelho AC. Comparative analysis of the geographic distribution of the histopathological spectrum and *Leishmania* species of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *An Bras Dermatol.* 2012;87:369–74.

Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, Cacopardo B, Nunnari G. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed Res Int.* 2013;2013:805108.

Stuart K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. *Mol Biochem Parasitol.* 1983;9:93-104.

Tojal AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health.* 2006;11:1388-98.

Tuon FF, Amato VS, Floeter-Winter LM, de Andrade Zampieri R, Amato Neto V, Siqueira França FO, Shikanai-Yasuda MA. Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids—first report. *Int J Dermatol.* 2007;46:628–30.

Tuon FFA, Gomes-Silva AB, Da-Cruz AMB, Duarte MISC, Amato Neto VD, Amato VSE. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin Immunol.* 2008;128:442–6.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD JR, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002;186:1829-34.

Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol.* 1991;72:157–63.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. *J Eukaryotic Microbiol.* 1994;41:324–30.

Vaish M, Mehrotra S, Chakravarty J, Sundar S. Noninvasive molecular diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2011;49:2003–5.

Van Der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, Peekel I, Schallig H. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J Clin Microbiol.* 2008;46:73–8.

Vega BAF, Cimino R0, Cajal PS, Juarez MV, Villalpando CA, Gil JF, Marcipar IS, Krolewiecki AJ, Nasser JR. Performance of different *Trypanosoma cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina. *Trop Med Int Health.* 2013;18:1103-9.

Venazzi EAS, Roberto ACBS, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoni MVC, Silveira TG. Detection of *Leishmania* (*Viannia*) DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2007;115:399–402.

Vergel C, Walker J, Saravia NG. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:423–9.

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

Vexenat AC, Santana JM, Teixeira AR. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996;38:177-85.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 2004;90:31-7.

Vries HJC, Reedijk SH, Schallig HDFH. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol.* 2015;16:99–109.

Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:781-91.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J Clin Microbiol.* 2002;40:601-6.

Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3892-904.

Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR, De Magalhães AV, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope*, 1989;99:925–39.

Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Lima ACS, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High Resolution Melting Analysis Targeting Hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:e0004485.