

REVISÃO DE LITERATURA

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: UMA REVISÃO DE LITERATURA

DIAGNOSTIC METHODS OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS: A LITERATURE REVIEW

Pedro Henrique Pietrzaki Cerutti¹, Carine Gonçalves Lopes¹, Fabio Gonçalves Lopes Filho¹, Virgílio Ribeiro Guedes².

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*. De acordo com a OMS é uma das doenças de maior importância mundial, e se encontra em expansão pelo país, devido ao avanço urbano nas áreas endêmicas do seu vetor. A sua variedade de espécies e manifestações atípicas comuns transformam o diagnóstico da leishmaniose tegumentar uma tarefa difícil para os médicos. Uma anamnese completa, conhecimentos sobre a epidemiologia e métodos de diagnóstico são essenciais para a confirmação da doença no período inicial. Ao partir do princípio de que não existe exame padrão ouro para a LTA, este trabalho reúne informações sobre diferentes métodos diagnósticos e empregabilidade desses testes, de forma a direcionar o pensamento clínico e facilitar a confirmação da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana; Diagnóstico da leishmaniose tegumentar; Ferramentas diagnósticas LTA.

 ACESSO LIVRE

Citação: Cerutti PHP, Lopes CG, Lopes Filho FG, Guedes VR (2017) Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão de literatura. Revista de Patologia do Tocantins, 4(4): 55-59.

Instituição: ¹Acadêmico(a) de Medicina, Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brasil; ²Docente, Médico Patologista, Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, Brasil.

Autor correspondente: Pedro Henrique Pietrzaki Cerutti;
pedrohcerutti@gmail.com

Editor: Guedes V. R. Medicina, Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

Publicado: 01 de dezembro de 2017.

Direitos Autorais: © 2017 Cerutti et al. Este é um artigo de acesso aberto que permite o uso, a distribuição e a reprodução sem restrições em qualquer meio, desde que o autor original e a fonte sejam creditados.

Conflito de interesses: os autores declararam que não existem conflitos de interesses.

ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is an infectious disease caused by the protozoan of the genus *Leishmania*. According to WHO, it is one of the most important diseases worldwide, and is expanding in the country, due to the urban advance in the endemics areas of the vector. The variety of species and common atypical manifestations make the diagnosis of cutaneous leishmaniasis a difficult task for physicians. A thorough history, knowledge of the epidemiology and methods of diagnosis are essential for the confirmation of the disease in the initial period. Assuming that there is no gold standard trial for ATL, this work gathers information on different diagnostic methods and employability of these tests, in order to direct clinical thinking and facilitate the confirmation of the disease.

Keywords: American tegumentary leishmaniasis; Diagnosis of tegumentary leishmaniasis; ATL diagnostic tools.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença endêmica em diversas regiões do nosso país, com relatos tão antigos quanto 1895, sob o nome de botão da Bahia. (VALE; FURTADO, 2005)

Em expansão no país, pelo avanço urbano sobre as áreas de floresta, habitat natural do seu vetor, os mosquitos do gênero *Lutzomyia*, sua incidência fica atrás apenas da malária na categoria de doenças causadas por protozoários. (BARCAROL et al., 2011)

Seus agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* e no Brasil a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* o principal agente etiológico envolvido com a apresentação clássica da doença. (FERNANDES et al., 2016)

Diversas outras espécies de *Leishmania* estão catalogadas no país, como *L. (V.) guyanensis* aparentemente limitada a bacia do Amazonas e *L. (L.) amazonensis* que se distribui desde o Amazonas até o sudeste de Minas Gerais, entre outras. (FERREIRA; GOMES; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2015; FIOCRUZ, 2016)

Essa variedade de espécies, assim como polimorfismos, em território nacional implica em dois desafios para os médicos, as apresentações atípicas muito comuns, de apresentação similar ao grupo de doenças infecciosas conhecidas pela sigla PLECT (paracoccidiodomicose, leishmaniose, esporotricose, cromomicose e tuberculose), e o perfil de resistência às drogas encontrado entre as diferentes cepas de protozoários. (FERREIRA; GOMES; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2015; SHIRIAN et al, 2014; BARCAROL et al, 2011)

O sucesso do diagnóstico e tratamento da doença baseia-se, portanto, numa anamnese sólida, conhecimentos sobre a epidemiologia e exames complementares para confirmação da doença. (GOMES et al., 2014)

Existem diversos exames e testes empregados no diagnóstico da LTA, esses variam muito de sensibilidade e especificidade, não existindo um exame considerado padrão ouro, (ANDRADE et al., 2005).

São empregados exames que têm como base o uso de antígenos, testes sorológicos, exame direto e histopatológica, imunofluorescência, cultura e reações em cadeia de polimerase (PCR). O uso de testes seriados ou em paralelo pode ser necessário, por isso é preciso levar em conta as propriedades de cada exame, assim como a disponibilidade desses nas diferentes redes de saúde nacionais. (ASSIS et al., 2015)

Esse trabalho tem como objetivo revisar e atualizar os conceitos dos testes diagnósticos aplicados na investigação dos casos de LTA, dessa forma fornecer informação sólida para que o médico de qualquer região do país possa confirmar o diagnóstico da doença em tempo e com o uso de recursos adequados.

MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido através de pesquisas bibliográficas nas bases de dados Pubmed, Scielo, Lilacs e Google acadêmico que ocorreram no período de janeiro a

junho de 2017. Foram pesquisadas palavras chave como “Leishmaniose tegumentar”, “diagnóstico da Leishmaniose tegumentar” e “ferramentas diagnósticas LTA”. Com a seleção de referências bibliográficas de relevância, foi preparado este trabalho de revisão sobre os métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana, que aborda desde métodos conceituados e praticados em todo o mundo, até as novas propostas em estudo.

DESENVOLVIMENTO

As manifestações clínicas da LTA são bastante variáveis e dependem de fatores relacionados ao hospedeiro e ao parasita. A apresentação mais clássica é a chamada leishmaniose cutânea localizada, que inicialmente se apresenta como um ponto eritematoso no local da picada do mosquito, esse evolui ao longo de 2 a 12 semanas para uma pápula e então para uma úlcera no período de 6 meses. Manifestações aberrantes a essas devem ser investigadas, pois simulam a aparência das lesões presentes no já citado grupo de doenças PLECT. (GUIMARÃES et al., 2005)

Outras apresentações são a Leishmaniose disseminada cutânea e a difusa cutânea, a primeira caracterizada pela presença de mais de 10 placas como a acima descrita ou como lesão acneiforme, pode afetar as mucosas e acredita-se estar relacionada a disseminação linfática dos parasitas, na segunda as lesões tendem a ser nodulares ou em extensas placas difusas, que raramente ulceram e estão ligadas a deficiências na resposta imunológica do hospedeiro (MACHADO et al., 2004; VIANA et al., 2013)

Na forma mucosa são encontradas lesões ulceradas, muitas vezes associadas a deformidades na estrutura facial, com apresentação comum no septo nasal, associada fortemente a infecção por *L. (L.) braziliensis*. (GOMES et al., 2014)

Demais lesões atípicas são relacionadas a pacientes infectados por HIV e também com vírus endógenos do protozoário ligados a exacerbação dos sintomas em murinos. (PARMENTIER et al., 2016)

Papel da epidemiologia

Relatos de viagens para zonas de mata nativa, ou regiões de forte endemia para a doença são informações de grande valia para a suspeita diagnóstica da doença, no entanto, a rápida expansão dos territórios urbanos torna provável a infecção pelo protozoário em pacientes sem o histórico de viagens. (MAGALHÃES; MOURA, 2015)

Regionalismos em relação as espécies de *Leishmania* demonstram ser bastante significativos em relação a evolução das lesões e perfil de resistência a drogas, cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, são as mais comuns nas regiões centro-oeste, sudeste, mas estão presentes em todo Brasil, as regiões amazônicas e também o nordeste do país tem incidências mais altas de protozoários atípicos como o *Leishmania (Viannia) naiffi* e *L. (V.) panamensis*. (FERREIRA; GOMES; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2015; FAGUNDES-SILVA et al., 2015)

Emprego dos exames complementares

Frente a suspeitas clínicas e epidemiológicas da presença de LTA, o próximo passo é traçar uma estratégia para a confirmação diagnóstica da doença. Devido a ausência de um exame padrão ouro, os testes devem ser escolhidos em função do tempo de evolução da doença, nível de complexidade do teste e viabilidade de aplicação do mesmo. (GOMES et al., 2014)

Segue uma descrição dos testes disponíveis para diagnóstico da LTA no Brasil.

Reação de Montenegro

O teste intradérmico de Montenegro, já existe há mais de 90 anos e representa o principal exame complementar para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em áreas endêmicas, trata-se de uma coleção de antígenos extraídos de culturas de *Leishmania spp.* de acordo com os agentes etiológicos locais e baseia-se na resposta imunológica desenvolvida após o contato com o protozoário. Consiste na inoculação dos antígenos na derme do paciente, após 48 a 72 horas do procedimento este é reavaliado, 4 linhas são traçadas nos pontos cardiais da aplicação, de mais distante para mais próximo, até ser detectada, no local da aplicação, uma região endurecida, é considerado positivo se o diâmetro da placa for maior do que 5 mm. (JOSÉ et al., 2001)

Essa reação de hipersensibilidade tardia possui sensibilidade variando entre 86% a 100%, no entanto, reações cruzadas do coquetel de antígenos utilizado diminuem bastante a especificidade dessa técnica, também devem ser consideradas as seguintes peculiaridades do teste, existe uma janela imunológica de até 4 meses após a infecção para a reatividade positiva do teste, nem diferencia infecções atuais e passadas, o que exclui seu valor em pacientes com o histórico positivo e costuma ser negativa em LTA com apresentação cutânea difusa e em pacientes imunossuprimidos. Pode estar positiva em indivíduos sadios de zonas endêmicas, o que indica a possibilidade de infecções subclínicas, mas de forma geral o teste pode ser considerado de bom valor preditivo negativo. (ANDRADE et al., 2005)

Testes sorológicos

O diagnóstico sorológico da LTA é uma ferramenta de uso controverso na literatura, com alguns autores que consideram o uso dessa ferramenta bastante limitado. (ZEYREK; KORKMAZ; OZBEL, 2007; POMARES et al., 2012)

A sensibilidade e especificidade desses testes varia bastante segundo o método utilizado, as reações de imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e Western blot são as mais citadas nos trabalhos sobre o assunto, com os dois primeiros alcançando uma sensibilidade de 90% e o terceiro até 100%, mas apresentando maior complexidade e custo que os demais. Nesses casos a realização de testes em paralelo pode aumentar a sensibilidade os exames. (ZEYREK; KORKMAZ; OZBEL, 2007; SZARGIKI et al., 2009)

Fato a ser considerado na análise dos resultados dos testes sorológicos é a possibilidade de reações cruzadas com

infecções caudadas por outros protozoários da família tripanosoma, como o *T. cruzi*, causador da doença de chagas, que tem perfil de endêmico semelhante ao da LTA, o que diminui a especificidade do teste. (LUCIANO et al., 2009)

Outros fatores que devem ser considerados são que testes realizados nos 3 primeiros meses de infecção tendem a ser negativos, assim como os empregados em pacientes que possuem a forma difusa da doença e imunossuprimidos de forma semelhante ao que é observado na reação de Montenegro. (ANDRADE et al., 2005)

Novos antígenos alvo para os testes sorológicos tem sido estudados para assim diminuir o número de reações cruzadas e também aumentar sua sensibilidade para detecção de antígenos referentes a forma amastigota e promastigota do protozoário, empregando proteínas recombinantes obtidas a partir de uma seleção de proteínas mais específicas do agente etiológico, algumas com a sensibilidade e especificidade de até 100%, como a tryparedoxin peroxidase. (DUARTE et al., 2015; MENEZES-SOUZA et al., 2015)

Outro papel dos testes sorológicos é o acompanhamento dos títulos de IgM e IgG dos indivíduos como forma de atestar a cura clínica, pois estes tentem a permanecer estáveis ou decrescer ao longo do primeiro ano após a cura clínica e o aumento dos títulos tem potencial de prever a recidiva da doença. (FAGUNDES-SILVA et al., 2015)

Exame parasitológico direto

Indicado como exame de primeira escolha para a avaliação da LTA no Brasil pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), apresenta a vantagem de ser rápido e fácil de ser coletado e virtualmente confirma o diagnóstico em caso do achado da amastigota, a coleta do material pode ser feita pelo raspado da lesão, aspirado por agulha fina (PAF) ou mesmo pelo lavado da cavidade oral e nasal. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Tem melhores resultados nas primeiras semanas e meses da instalação da doença, quando a contagem de parasitas é maior, sua sensibilidade decresce ao longo dos meses de evolução da lesão, a sensibilidade é maior com o método PAF quando comparado com o raspado da lesão, 89% conta 80%. (HOSSEINZADEH; OMIDIFAR; LOHRASB, 2012)

Vantagens da coleta em gota espessa sobre o esfregaço fino já foram observadas em estudos de campo, com diferenças também em relação ao tempo de detecção do protozoário relacionadas com o tipo de coloração utilizado nas lâminas, entre Papanicolau, hematoxilina eosina, Diff Quick e Wright Giemsa, o último possibilitou a detecção da *Leishmania* em tempo consideravelmente menor que as demais, fato ligado ao melhor contraste obtido por esse método entre as amastigotas e os elementos do sangue periférico. Porém sem diferenças em relação a sensibilidade entre os contrastes. (SAAB et al., 2015)

Exame Histopatológico

Ferramenta clássica no diagnóstico da LTA, a biópsia deve ser feita nas bordas das lesões onde a carga parasitária é maior e com os devidos cuidados para manipulação e armazenamento do tecido observados. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Uma boa opção para diagnóstico de lesões recentes e crônicas, a aplicação de técnicas de imunocitoquímica e imuno-histoquímica amplia grandemente a sensibilidade do teste, com níveis comparáveis as técnicas de cultura e PCR, abordadas a seguir e consideradas as técnicas mais sensíveis. (DUARTE; ROCHAEL, 2006)

As biópsias podem ser obtidas pela técnica de “punch”, com a qual fragmentos de 3 a 5 mm são retirados facilmente, o local deve ser apropriadamente limpo e a degermação feita, o fragmento deve ser manipulado sem que as estruturas sejam danificadas e conservado em álcool. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Esses cuidados facilitam a visualização da *Leishmania spp.* dessa forma aumentam a especificidade do teste, pois diminuem a ocorrência de artefatos e a deformação dos elementos a serem observados. (VIANA et al, 2013)

Cinco padrões histológicos foram descritos para LTA em trabalhos de Ridley et al. (1980) são eles, 1) Reação Exsudativa Celular, constituída por um infiltrado histiolinfoplasmocitário; 2) Reação Exsudativa e Necrótica, na qual ocorre uma necrose no seio do infiltrado inflamatório; 3) Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa, que corresponde ao quadro descrito como inflamação crônica granulomatosa com necrose; 4) Reação Exsudativa e Granulomatosa, onde se observa uma reação granulomatosa desorganizada, sem que esteja presente necrose tecidual; 5) Reação Exsudativa e Tuberculóide, caracterizada pelo granuloma tuberculóide.

O tipo 1 foi identificado por Magalhães et al. (1986) como o mais incidente em seu trabalho, as demais formas podem representar verdadeiros desafios diagnósticos por suas semelhanças com outras patologias. (AOUN et al, 2014)

Cultura

Considerado o método mais específico de identificação da leishmaniose, é pouco utilizado por seu alto custo e baixa sensibilidade. Os meios de cultivo *in vitro* empregados podem ser o NNN – Novy, MacNeal, e Nicolle e LIT (Liver Infusion Triptose) ou Schneider acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), e com cultivo entre 24°C e 26°C, com resultado esperado para o prazo de 5 dias. Mesmo que não ocorra o crescimento nesse prazo, a amostra deve ser observada por 30 dias. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

A microcultura é uma opção mais rápida, apenas 2 dias, menos dispendiosa e demonstrou uma acurácia diagnóstica superior à da cultura tradicional, com a desvantagem de produzir menos formas amastigotas que a cultura tradicional. (MARTINS et al, 2014)

Culturas *in vivo* são uma opção que carrega certos dilemas éticos e demanda maior aptidão técnica para ser executada, por esses motivos não costumam ser empregadas no diagnóstico da LTA. (GOMES et al., 2014)

Diagnóstico molecular

Considerado o método de maior sensibilidade e especificidade dentre todos os já apresentados, o PCR infelizmente tem uso limitado por ser caro e de execução complexa, por isso fica limitado aos grandes centros e laboratórios de pesquisa. (BOGGILD et al, 2008)

Os materiais para extração do material genético são os mais variados, desde amostras coletadas e condicionadas em papel filtro, há amostras de raspados, fragmentos de biópsias congelados ou em parafina, qualquer material biológico que contenha fragmentos de DNA de *Leishmania spp.* poderá ser utilizado. (SILVA et al, 2012)

Certa variação na sensibilidade dos testes ocorre em diferentes publicações, esta costuma variar entre 70% a 100%, o que pode ser explicado por diferentes métodos de extração e armazenamento do material biopsiado, além de formas distintas para a manipulação e obtenção dos materiais genéticos. A especificidade é considerada de 100%. (SHIRIAN et al., 2014; PRESTES et al., 2015; SAAB et al., 2015)

Outra possibilidade é a utilização das técnicas de reação da transcriptase reversa (RT-PCR) e Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição – (RFLP-PCR), para o aumento da sensibilidade e determinação das espécies de *Leishmania*. (FERREIRA; GOMES; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2015; GOMES et al., 2014)

Uma técnica promissora de diagnóstico por PCR em campo vem sendo estudada por Saldarriaga et al. (2016), esta apresenta a sensibilidade próxima de 100%, com métodos de extração de material nuclear de fácil aplicação e possibilidade de especificação das cepas.

COMENTÁRIOS

Definir o diagnóstico dessa doença de perfil grave e tratada com um perfil de drogas de alta toxicidade é fundamental para o bom prognóstico e está nos princípios do que é a boa prática médica. Observados os critérios clínicos, epidemiológicos e a aplicabilidade das ferramentas diagnósticas com suas indicações e peculiaridades, descritas nesse trabalho, é possível traçar uma estratégia diagnóstica eficiente para a determinação da doença. Os critérios para a escolha do teste podem ser definidos em relação a forma de apresentação da doença, tempo de instalação, fatores relacionados a imunidade do hospedeiro e disponibilidade dos meios diagnósticos, o que pode ser definido de forma simples pelo médico ao analisar as informações contidas nesse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, Bruno B. et al. Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. *Gaz. Méd. Bahia*, [salvador], v. 75, n. 1, p.75-82, jan. 2005.
2. AOUN J et al. Caseating Granulomas in Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8(10): e3255, 2014
3. ASSIS, Tália Santana Machado de et al. Study of implementation and direct cost estimates for diagnostic tests for human visceral leishmaniasis in an urban area in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, RJ, v. 31, n. 10, p.2127-2136, out. 2015.
4. BARCAROL, Leandro Nicola et al. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão da literatura. XVI Seminário Interinstitucional de Ensino, Pesquisa e Extensão: universidade no desenvolvimento regional, [s. L.], 2011.
5. BOGGILD, Andrea K. et al. Optimization of Microculture and Evaluation of Miniculture for the Isolation of *Leishmania* Parasites from Cutaneous Lesions in Per. Am. J. Trop. Med. Hyg. [s. L.], v. 79, n. 6, p.847-852, 2008.

6. RIDLEY, DS. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, [s. L.], v. 74, p.515-521, 01 jan. 1980.
7. DUARTE, Maria Luisa; ROCHAEL, Mayra Carrijo. Perfil histopatológico e imuno-histoquímico da leishmaniose tegumentar americana com ênfase nos dendrócitos dérmicos FXIIIa+. *An Bras Dermatol*. 2006, Maceió - (AL), v. 81, n. 6, p.541-548, 03 maio 2006.
8. DUARTE, Mariana C. et al. Proteins Selected in Leishmania (Viannia) braziliensis by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. *Clinical And Vaccine Immunology*, [s. L.], v. 22, n. 11, p.1187-1196, nov. 2015.
9. FAGUNDES-SILVA, Gisele Aparecida et al. Leishmania (Viannia) naiffi: rare enough to be neglected? *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ*, v. 110, n. 6, p.797-800, set. 2015.
10. FERNANDES A. C. B. S., et al. *American cutaneous leishmaniasis with unusual clinical presentation and response to treatment. Rev inst med trop São Paulo*. 2016;58:20.
11. FERREIRA, L.T.; GOMES, A.H.S. & PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L. - *Genotype characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis isolated from human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 57(3): 257-262, 2015.
12. FIOCRUZ LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. 2016. Disponível em: <http://www.cpqrr.fiocruz.br/informacao_em_saude/CICT/Leishmaniose.htm>. Acesso em: 18 ago. 2017.
13. GOMES, Ciro Martins et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [s.l.], v. 89, n. 5, p.701-711, 2014.
14. GUIMARÃES, Luiz Henrique et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia*, [salvador], v. 75, n. 1, p.66-74, jan. 2005.
15. HOSSEINZADEH, Massood; OMIDIFAR, Navid; LOHRASB, Mohamad Hosein. Use of fine needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the conventional scraping method. *Trop Doct.*, [s. L.], v. 42, n. 2, p.112-113, abr. 2012.
16. JOSÉ, Fábio Freire et al. Avaliação do poder sensibilizante da reação Montenegro. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, [s. L.], v. 34, n. 6, p.537-542, nov. 2001.
17. LUCIANO, Raquel Martins et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de Leishmania spp e Trypanosoma cruzi na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, SP, v. 46, n. 3, p.181-187, 2009.
18. MACHADO, Paulo R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [s. L.], v. 79, n. 6, p.647-664, dez. 2004.
19. MAGALHÃES, Albino Verbosa de et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por leishmania braziliensis braziliensis padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev. Inst. Med. Trop, São Paulo, SP*, v. 28, n. 4, p.253-262, jul. 1986.
20. MAGALHÃES, Sandra Célia Muniz; MOURA, Káthia Viviane Ramos de. A expansão da leishmaniose tegumentar americana no município de Montes Claros - Minas Gerais. *Revista brasileira de geografia médica e da saúde*, [Minas Gerais], v. 21, n. 11, p.80-92, dez. 2015.
21. MARTINS, Ana Luiza Grizzo Peres et al. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *Plos Neglected Tropical Diseases*, São Paulo, Sp, v. 89, n. 1, p.52-58, 2014.
22. MENEZES-SOUZA D; et al. *Improving Serodiagnosis of Human and Canine Leishmaniasis with Recombinant Leishmania braziliensis Cathepsin L-like Protein and a Synthetic Peptide Containing Its Linear B-cell Epitope. PLoS Negl Trop Dis 9(1): e3426, 2015.*
23. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 189 p. : il.
24. PARMENTIER, Laurent et al. Case Report: Severe Cutaneous Leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus Patient Coinfected with Leishmania braziliensis and Its Endosymbiotic Virus. *The American Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, [s. L.], v. 94, n. 4, p.840-843, 2016.
25. POMARES C; et al. Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012 Jul;106:452-454
26. PRESTES, Suzane Ribeiro et al. Polymerase chain reaction-based method for the identification of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in mucosal tissues conserved in paraffin. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Manaus, AM.*, v. 48, n. 5, p.555-559, set. 2015.
27. SAAB, Mario et al. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis: Why Punch When You Can Scrape? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, [s. L.], v. 92, n. 3, p.518-522, 2015.
28. SALDARRIAGA O. A. et al. *Na Innovative Field Applicable Molecular Test to Diagnose Cutaneous Leishmania Viannia spp. Infections. PLoSNeglTrop Dis10(4):e0004638. 2016*
29. SHIRIAN, Sadegh et al. Comparison of Conventional, Molecular, and Immunohistochemical Methods in Diagnosis of Typical and Atypical Cutaneous Leishmaniasis. *Arch Pathol Lab Med*, [s. L.], v. 138, n. 1, p.235-240, fev. 2014.
30. SILVA, João Guilherme Lino da et al. Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from Leishmania in biological samples from patients with American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte, MG.*, v. 45, n. 2, p.257-259, mar. 2012.
31. SZARGIKI, Regiane et al. Comparison of Serological and Parasitological Methods for Cutaneous Leishmaniasis Diagnosis in the State of Paraná, Brazil. *The Brazilian Journal Of Infectious Diseases*, [s. L.], v. 13, n. 1, p.47-52, fev. 2009.
32. VALE, Everton Carlos Siviero do; FURTADO, Tancredo. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia* Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [s. L.], v. 80, n. 4, p.421-428, 2005.
33. VIANA, Agostinho Gonçalves et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [s. L.], v. 88, n. 1, p.32-40, jun. 2013.
34. ZEYREK FY, KORKMAZ M, OZBEL Y. Serodiagnosis of anthroponotic cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by Leishmania tropica in Sanliurfa Province, Turkey, where ACL is highly endemic. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:1409-1415.