

Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”

UNIGRANRIO

MARIANA DUQUE ESTRADA DE ALMEIDA MEDEIROS

**VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO MÉTODO TRADICIONAL DE CULTURA NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

RIO DE JANEIRO

2025

**Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”
UNIGRANRIO**

MARIANA DUQUE ESTRADA DE ALMEIDA MEDEIROS

**VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO MÉTODO TRADICIONAL DE CULTURA NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio “Prof. José de Souza Herdy”, como
requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Luciana de Freitas Campos
Miranda

**RIO DE JANEIRO
2025**

MARIANA DUQUE ESTRADA DE ALMEIDA MEDEIROS

**VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO MÉTODO TRADICIONAL DE CULTURA NO
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

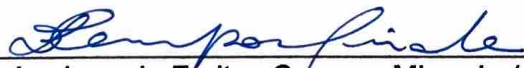
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade do Grande
Rio "Prof. José de Souza Herdy", como
requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Luciana de Freitas Campos
Miranda

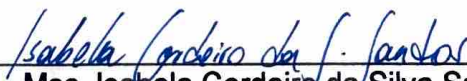
Aprovada em:

Barra da Tijuca, 03 de Novembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA



Dsc. Luciana de Freitas Campos Miranda (orientador)



Msc. Isabela Cordeiro da Silva Santos



Dsc. Wallace Pacienza Lima

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus, por me sustentar ao longo desta caminhada, renovar minhas forças nos momentos de fraqueza e manter vivo em mim o desejo de realizar meus sonhos.

Agradeço aos meus pais pelo investimento na minha educação e pelo apoio constante em cada etapa desta jornada. Ao meu pai, por estar presente à sua maneira, por me apoiar no que pôde e por torcer pelas minhas conquistas, esse apoio fez diferença na minha caminhada. À minha mãe, pelos conselhos, pela presença nas madrugadas difíceis e pelas palavras que me confortaram quando pensei em desistir, oferecendo sempre o incentivo necessário para continuar.

Aos meus amigos, deixo minha gratidão pelo companheirismo e pela motivação, por estarem ao meu lado nos dias em que tudo parecia desandar e por me lembrarem, com leveza e carinho, de acreditar no meu próprio caminho.

Sou profundamente grata à minha orientadora, que desde a iniciação científica despertou em mim o encanto por estudar as leishmanioses. Agradeço pela paciência, pela dedicação e pelo cuidado em cada orientação, que foram essenciais para aprimorar minhas ideias e dar forma a este trabalho.

Agradeço também aos professores que, com seus ensinamentos, contribuíram para a minha formação acadêmica e fortaleceram ainda mais o amor pela área que escolhi seguir.

Não posso deixar de agradecer a mim mesma: por ter mantido a coragem mesmo entre lágrimas, cansaço e incertezas; por seguir em frente quando seria mais fácil parar; pela força, pela dedicação e pelo compromisso de sempre dar o meu melhor, buscando crescer a cada dia.

Por fim, agradeço aos meus avós, que sempre acreditaram em mim, celebraram minhas conquistas e se alegraram com cada vitória. Obrigada pelo primeiro jaleco, pelo incentivo aos estudos desde o início e pelo amor constante. Que meu avô, do céu, receba toda a minha gratidão e saiba o quanto sua presença segue viva em tudo o que conquisto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Flebotomíneo vetor de <i>Leishmania</i>	10
Figura 2 - Ciclo holometabólico dos Flebotomíneos.....	11
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	11
Figura 4 - Classificação taxonômica das espécies de <i>Leishmania</i>	12
Figura 5 - LTA - Lesão cutânea ulcerada.....	13
Figura 6 - LTA- Forma mucosa com lesão ulcerada do palato mole	13
Figura 7 - LTA- Forma cutânea disseminada.....	14
Figura 8 - Antimoniato de meglumina (Glucantime) – tratamento de primeira escolha da LTA.....	15
Figura 9 - Cultura de <i>Leishmania</i> na forma promastigota - leitura de lâmina em microscópio óptico.....	16
Figura 10 - Cultura de <i>Leishmania</i> em expansão (crescimento) em garrafa de cultivo.....	17
Figura 11 - Cultura em meio bifásico fase sólida NNN + fase líquida Schneider's	18
Figura 12 - Meios de Cultura em tubo de ensaio e em garrafa.....	18
Figura 13 - Contaminação por fungo em uma garrafa de cultura.....	20
Figura 14 - Contaminação de cultura com fungo (hifas).....	20
Figura 15 - Contaminação de cultura com fungo (hifas e leveduras).....	21
Figura 16 - Massa parasitária para caracterização por eletroforese enzimática (MLEE).....	21
Figura 17 - Isolados de <i>Leishmania</i> spp. criopreservados em nitrogênio líquido	22
Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose com os produtos de amplificação por nested-PCR.....	24
Figura 19 - Ilustração da coleção de amostras usando disco de fita.....	26
Figura 20 - Ilustração esquemática do uso de disco de fita, isolamento de DNA e identificação de espécies.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência de positivos em cada método de diagnóstico.....	25
Tabela 2 - Eficiência dos métodos de diagnóstico.....	25
Tabela 3 - Precisão diagnóstica da cultura a partir de biópsia e disco de fita..	28
Tabela 4 - Resumo dos principais métodos utilizados para o diagnóstico de Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Visceral.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Aspectos gerais	9
1.2 Diagnóstico	14
1.2.1 Diagnóstico parasitológico - Cultura	15
2 METODOLOGIA	21
3 RESULTADOS	22
3.1 Artigo 1: Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis (RASTI et al., 2016)	22
3.2 Artigo 2: A Novel Non-Invasive Diagnostic Sampling Technique for Cutaneous Leishmaniasis (TASLIMI et al., 2017).	25
3.3 Artigo 3: Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods (REIMÃO et al., 2020)	28
3.4 Artigo 4: Culture of Cutaneous Leishmania from Skin Biopsy Specimens (PAUN, 2022)	33
4 DISCUSSÃO	34
5 CONCLUSÃO	36
6 REFERÊNCIAS	36

VANTAGENS E LIMITAÇÕES DO MÉTODO TRADICIONAL DE CULTURA NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Mariana Duque Estrada de Almeida Medeiros¹
Luciana de Freitas Campos Miranda²

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de flebotomíneos infectados. Representa um importante problema de saúde pública devido à sua ampla distribuição geográfica e à diversidade de manifestações clínicas. O diagnóstico laboratorial da LTA é essencial para o manejo adequado dos casos, sendo o método tradicional de cultura uma das principais ferramentas utilizadas para o isolamento e a identificação do parasito. Essa técnica baseia-se no cultivo de amostras clínicas em meios específicos, como o Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e o Schneider's Drosophila Medium, frequentemente suplementados com soro fetal bovino e antibióticos para favorecer o crescimento do parasito e prevenir contaminações. Apesar de apresentar alta especificidade e permitir a caracterização biológica e genética do isolado, o método de cultura possui limitações, como a baixa sensibilidade em amostras com poucos parasitos, o tempo prolongado de incubação e a necessidade de condições laboratoriais adequadas para o sucesso do isolamento. Dessa forma, compreender as vantagens e limitações dessa técnica é fundamental para otimizar seu uso na rotina diagnóstica e aprimorar a acurácia dos resultados laboratoriais.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana. Cultura parasitológica. Diagnóstico. *Leishmania*. Meio de cultura.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted through the bite of infected sandflies. It represents a major public health problem due to its wide geographic distribution and the diversity of clinical manifestations. Laboratory diagnosis of ATL is essential for proper case management, and the traditional culture method remains one of the main tools used for parasite isolation and identification. This technique is based on the cultivation of clinical samples in specific media, such as Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) and Schneider's *Drosophila* Medium, often supplemented with fetal bovine serum and antibiotics to promote parasite growth and prevent contamination. Although it presents high specificity and allows biological and genetic characterization of isolates, the culture method has limitations, such as low sensitivity in samples with few parasites, long incubation periods, and the need for suitable laboratory conditions to ensure successful isolation. Therefore, understanding the advantages and limitations of this technique is essential to optimize its use in diagnostic routines and improve the accuracy of laboratory results.

Keywords: American tegumentary leishmaniasis. Parasitological culture. Diagnosis. *Leishmania*. Culture medium.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos infectados, conhecidos popularmente como “mosquitos-palha” ou “birigui”. Existe uma variedade de gêneros e espécies vetoras de *Leishmania*, dentre elas destaca-se o gênero *Lutzomyia* (figura 1). Trata-se de uma zoonose de grande relevância epidemiológica, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde fatores ambientais, como altas temperaturas, umidade elevada e a presença de matéria orgânica, favorecem a proliferação desses vetores (GONTIJO; CARVALHO, 2003; WHO, 2023). Estima-se cerca de 2 milhões de casos de leishmaniose tegumentar em todo o mundo, endêmica em mais de 80 países (JAHROMI et al., 2025).

Figura 1 - Flebotomíneo vetor de Leishmania

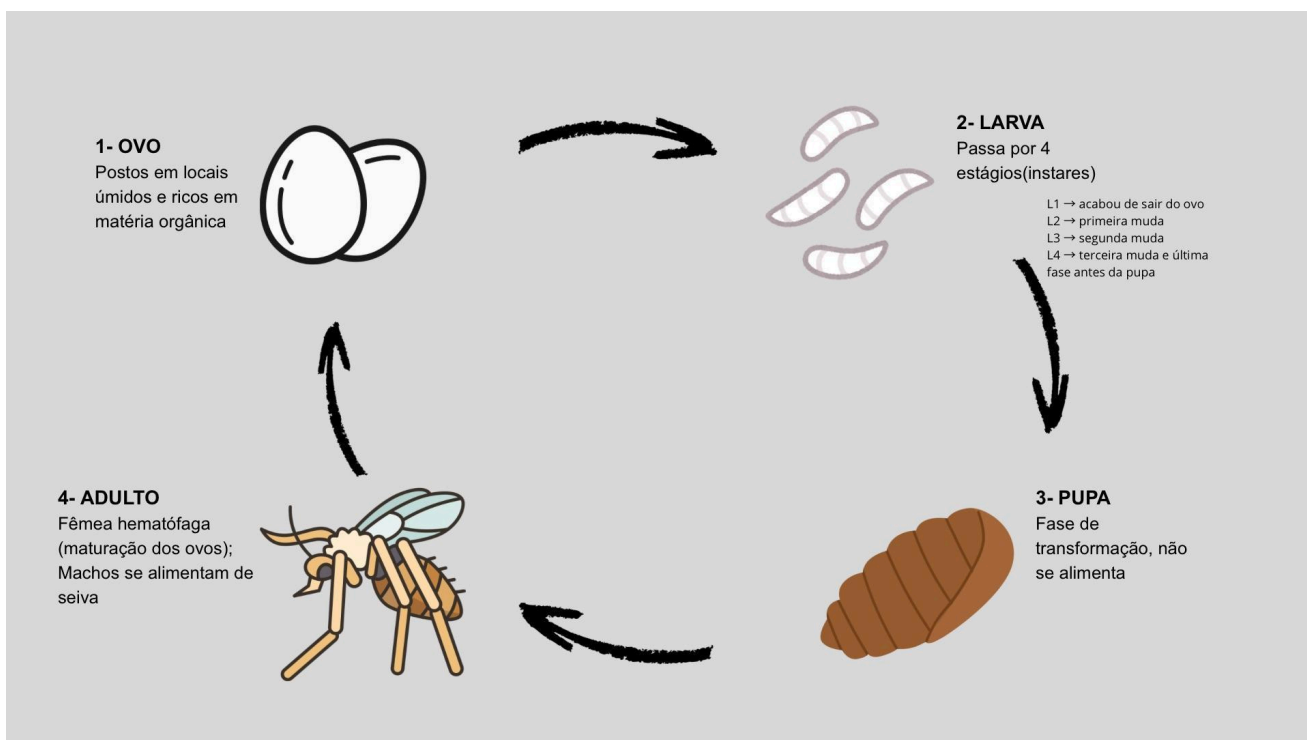


Fonte: Portal Fiocruz, 2022

Os flebotomíneos possuem um ciclo biológico holometabólico (figura 2), ou seja, seu desenvolvimento ocorre em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adultos. As fêmeas depositam seus ovos em locais úmidos e ricos em matéria orgânica em decomposição. Após a eclosão, as larvas passam por várias mudas antes de se transformarem em pupas, das quais emergem os adultos. As fêmeas, exclusivamente hematófagas, necessitam de sangue para a maturação dos ovos. Durante a alimentação em hospedeiros infectados, elas ingerem formas promastigotas do parasita *Leishmania*, que se desenvolvem e diferenciam no intestino do inseto, transformando-se em formas metacíclicas infectantes. Essas

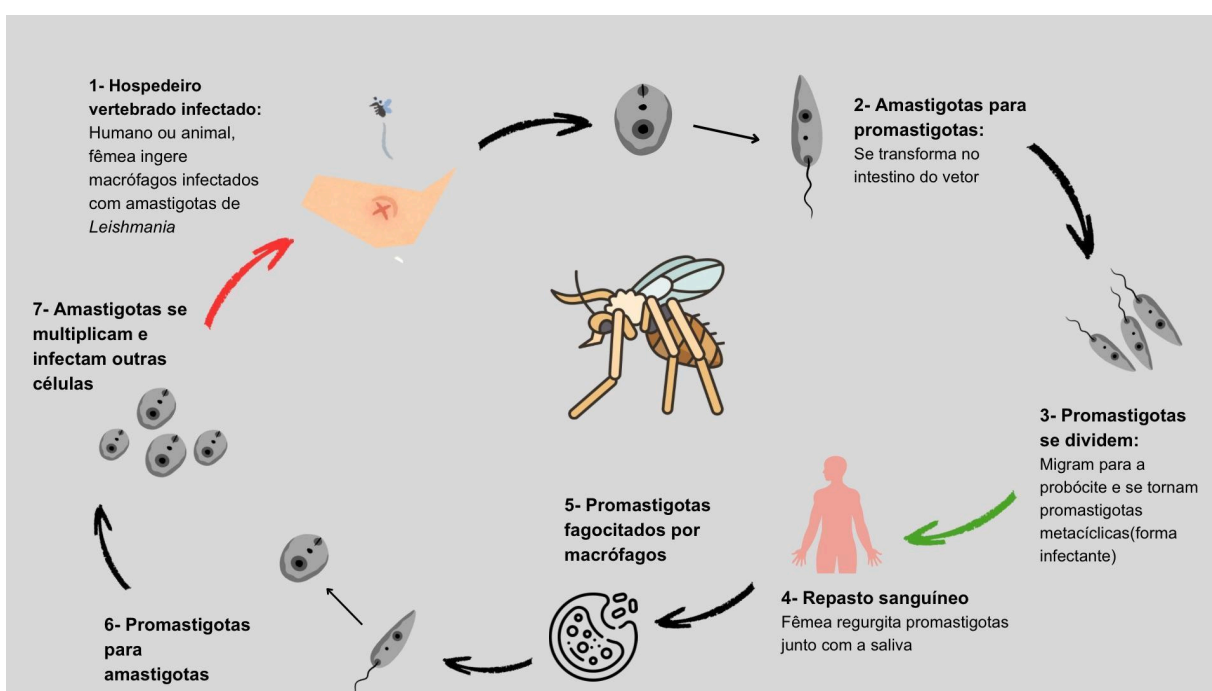
formas são transmitidas ao próximo hospedeiro vertebrado durante a picada, perpetuando o ciclo de transmissão da leishmaniose (figura 3) (CECÍLIO et al., 2022).

Figura 2 - Ciclo holometabólico dos Flebotomíneos



Fonte: Autoria própria (2025)

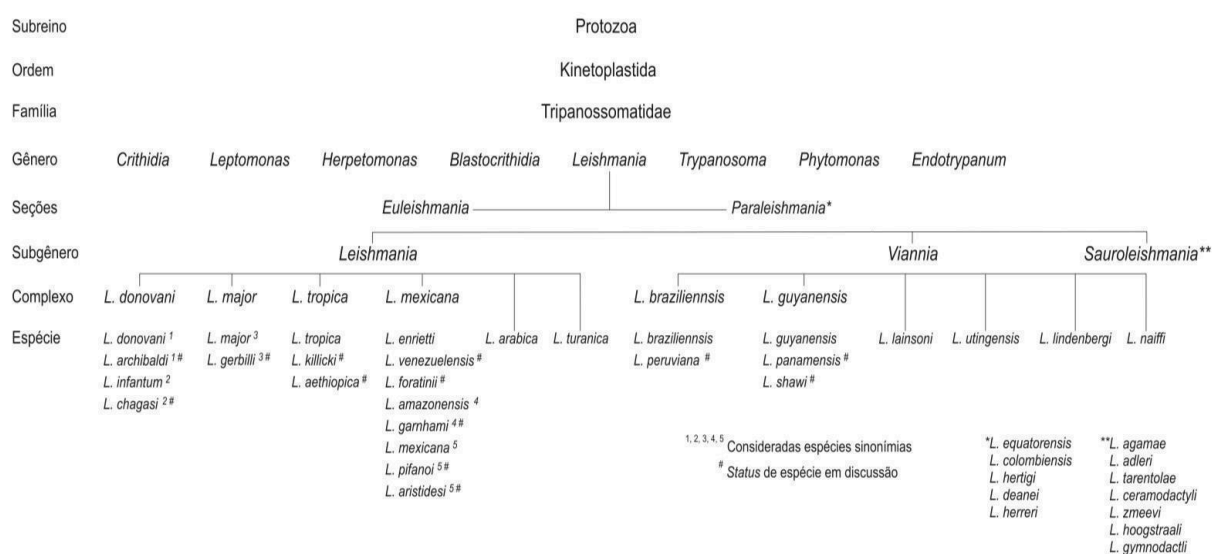
Figura 3 - Ciclo biológico de Leishmania



Fonte: Autoria própria (2025)

A distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar é ampla, ocorrendo em cerca de 85 países, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, como a África, Ásia, América Latina e regiões do Mediterrâneo (WHO, 2023). No Brasil, a doença é considerada endêmica, com registro de 14 espécies de *Leishmania*, das quais 8 possuem relevância médica (figura 4). Entre elas, destaca-se *Leishmania infantum*, agente etiológico da leishmaniose visceral (LV), e espécies como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenberg* e *L. lainsoni*, responsáveis pela leishmaniose tegumentar americana (LTA) (BRASIL, 2017; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Figura 4 - Classificação taxonômica das espécies de *Leishmania*



Números sobrescritos identificam as espécies em que há discussão quanto à validade taxonômica (possíveis sinónimas).

**Espécie questionada quanto à sua validade taxonômica dentro do gênero.

Fonte: CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014

As manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar americana (LTA) são bastante diversificadas, podendo variar desde lesões cutâneas localizadas (figura 5), lesões mucosas (figura 6) até formas disseminadas (figura 7), que acometem as regiões oral e/ou nasal. Essa ampla variedade de apresentações clínicas está relacionada tanto à espécie de *Leishmania* envolvida quanto à resposta imunológica

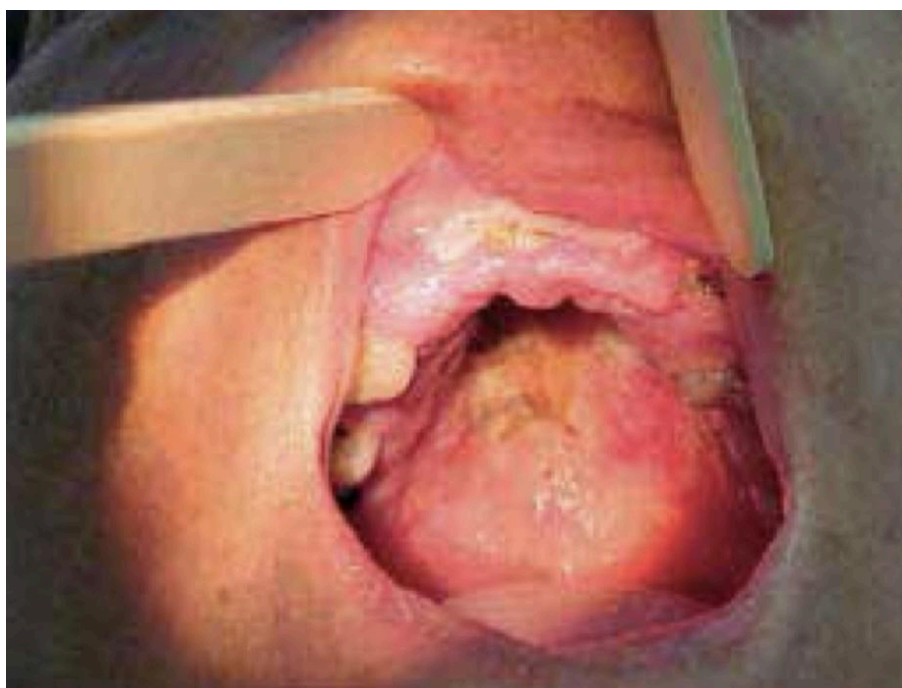
do hospedeiro, que influencia diretamente a evolução e a gravidade da doença (CECÍLIO et al., 2022).

Figura 5 - LTA - Lesão cutânea ulcerada



Fonte: Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar, 2017

Figura 6 - LTA- Forma mucosa com lesão ulcerada do palato mole



Fonte: Manual de Vigilância de Leishmaniose Tegumentar, 2017

Figura 7 - LTA- Forma cutânea disseminada



Fonte: Manual de Vigilância de Leishmaniose tegumentar, 2017

O tratamento da leishmaniose baseia-se no uso de agentes antimoniais pentavalentes, administrados por via intravenosa, intramuscular ou intralesional por um período de 20 a 30 dias, dependendo da gravidade do caso. Alternativas terapêuticas incluem Glucantime (figura 8), anfotericina B, pentamidina, miltefosina e medicamentos tópicos. A escolha do tratamento depende da forma clínica, do estado geral do paciente e da resistência do parasita na região (WHO, 2023).

Figura 8 - Antimoniato de meglumina (Glucantime) – tratamento de primeira escolha da LTA



Fonte: Arquivo do LaPClin VigiLeish, (2025)

A prevenção da leishmaniose está focada no controle dos vetores e na proteção contra picadas, uma vez que não há vacinas disponíveis. Os flebotomíneos possuem hábitos noturnos, reproduzindo-se em locais escuros, úmidos e ricos em matéria orgânica. Assim, estratégias como melhorias habitacionais, saneamento básico, manejo ambiental e eliminação de reservatórios animais são fundamentais para reduzir o risco de transmissão. A participação comunitária é crucial, incluindo práticas como limpeza de quintais, redução de matéria orgânica, uso de mosquiteiros e aplicação de repelentes, que ajudam a minimizar a exposição aos vetores (WHO, 2023).

1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose envolve a avaliação clínico-epidemiológica combinada a métodos laboratoriais. O padrão-ouro é a cultura parasitária, que permite o isolamento, a criopreservação e a caracterização do protozoário. Contudo, esse método apresenta limitações, como alto custo, necessidade de profissionais treinados e longo período de incubação. Outros métodos parasitológicos muito utilizados são: o exame direto e exame histopatológico. Métodos complementares, como exames sorológicos (ELISA) e testes de biologia molecular (PCR), também são amplamente utilizados combinados aos métodos parasitológicos (WHO, 2023).

A sensibilidade de cada método de diagnóstico pode variar de acordo com a experiência de cada serviço, a qualidade dos equipamentos e insumos utilizados, o tempo de evolução das lesões, as manifestações clínicas distintas associadas às diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção. Por esta razão, faz-se necessário o crescente aprimoramento das técnicas utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses (GRAÇA et al., 2012).

1.2.1 Diagnóstico parasitológico - Cultura

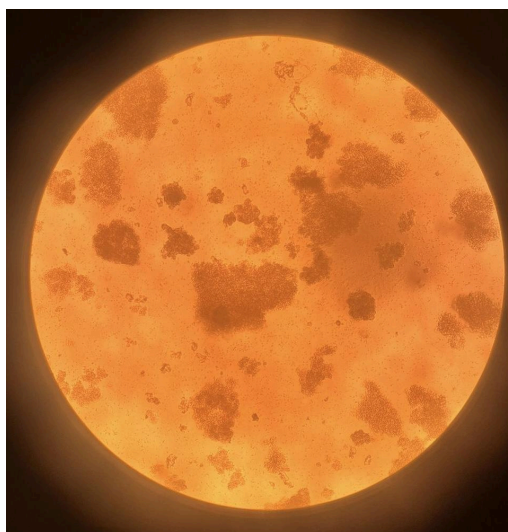
Para tal finalidade, fragmentos de tecido obtidos por biópsia da lesão cutânea ou da lesão mucosa são inoculados em meios de cultura apropriados. Nessas condições, o crescimento do parasito, na forma promastigota, pode ser observado a partir do quinto dia de incubação (figura 9). Contudo, recomenda-se a manutenção das culturas por até 30 dias antes da emissão de um resultado negativo, considerando que o crescimento pode ser tardio em alguns casos. Como alternativa à biópsia, é possível utilizar material obtido diretamente da lesão por meio de punção com tubo selado a vácuo (vacutainer) previamente contendo o meio de cultivo. Essa abordagem, além de ser menos invasiva, pode ampliar as possibilidades de diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar (CONCEIÇÃO-SILVA; MORGADO, 2014).

Figura 9 - Cultura de Leishmania na forma promastigota - leitura de lâmina em microscópio óptico.



Fonte: Imagem da autora (2025)

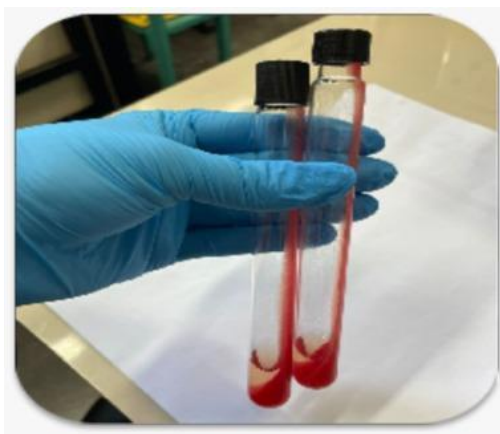
Figura 10 - Cultura de *Leishmania* em expansão (crescimento) em garrafa de cultivo.



Fonte: Imagem da autora (2025)

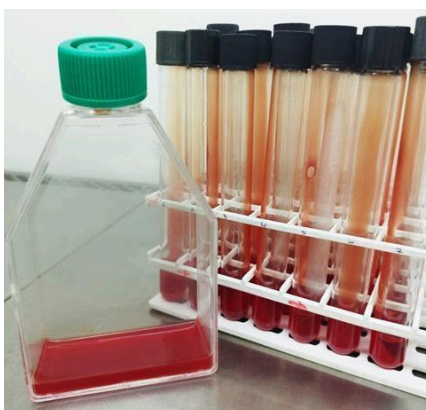
Para o cultivo *in vitro*, existem diversos tipos de meio de cultura, sendo eles sólidos, líquidos ou bifásicos. Levando em conta que o diagnóstico inicial costuma ser mais difícil, recomenda-se o uso de meios de sangue bifásico (SCHUSTER; SULLIVAN, 2002). Entre mais utilizados está o Novy–MacNeal–Nicolle (NNN), um meio bifásico que contém uma base semissólida enriquecida com sangue e uma fase líquida que serve como fonte de nutrientes (figura 14). Esse tipo de meio é tradicionalmente empregado para o isolamento primário das formas promastigotas de *Leishmania*, sendo considerado o padrão-ouro em muitos laboratórios (CASTELLI et al., 2023; PAUN, 2022). Outros meios também são utilizados para manutenção e crescimento do parasita, como o *Schneider's Drosophila*, o RPMI-1640 e o M199, que apresentam diferenças na composição nutricional, no pH e nas fontes de carbono e aminoácidos, influenciando diretamente o desenvolvimento e a adaptação das formas promastigotas (CARDOSO et al., 2019; CASTELLI et al., 2023).

Figura 11 - Cultura em meio bifásico fase sólida NNN + fase líquida Schneider's



Fonte: Arquivo do LaPClin VigiLeish (2025)

Figura 12 - Meios de Cultura em tubo de ensaio e em garrafa



Fonte: Arquivo do LaPClin VigiLeish (2025)

A suplementação dos meios de cultura é essencial para garantir o crescimento adequado do parasita. O soro fetal bovino (FBS ou SFB) é o suplemento mais empregado, geralmente adicionado em concentrações entre 10% e 20%, pois fornece proteínas, lipídios, vitaminas e fatores de crescimento necessários para a multiplicação das promastigotas (ABERRA et al., 2019; CASTELLI et al., 2023). Além disso, a adição de antibióticos como penicilina e estreptomicina é uma prática comum para evitar contaminações bacterianas, principalmente quando se trabalha com amostras clínicas obtidas a partir de lesões cutâneas (THAKUR et al., 2020; ABERRA et al., 2019).

A suplementação do meio de cultura *Schneider* com urina humana é empregada como uma alternativa simples e de baixo custo para manutenção de

culturas de *Leishmania* spp., já que esse fluido contém vitaminas, compostos nitrogenados e outros fatores de crescimento capazes de sustentar a multiplicação do parasito. A adição de urina esterilizada ao meio favorece a viabilidade e o desempenho do cultivo, reduzindo a dependência de suplementos mais onerosos, como o soro fetal bovino, sem prejudicar a adaptação e a estabilidade das formas promastigotas em laboratório. Dessa forma, seu uso representa uma estratégia prática para otimizar a rotina de manutenção de culturas, preservando a qualidade do crescimento parasitário e contribuindo para a padronização de métodos mais acessíveis (MELLO, 2009).

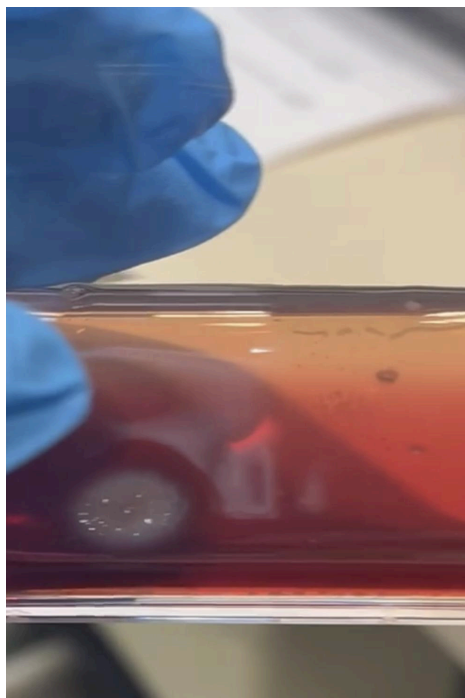
Em alguns casos, têm sido propostas variações do método tradicional, como a microcultura e a microcapillary culture, que utilizam volumes reduzidos de meio e proporcionam um crescimento mais rápido dos parasitas, aumentando a sensibilidade do teste, principalmente em amostras com baixa carga parasitária (PAGHEH et al., 2013; ABERRA et al., 2019). Alguns artigos mostram as vantagens das técnicas de minicultura e microcultura em relação à sensibilidade e tempo de diagnóstico, porém ainda existem poucos estudos na literatura com a aplicação e padronização dessas técnicas e comparação do seu desempenho em relação à cultura tradicional e outros testes diagnósticos (ALLAHVERDIYEV et al., 2004, 2005; BOGGILD et al., 2008).

Apesar das melhorias observadas com o uso de novos meios e variações técnicas, a cultura continua apresentando algumas limitações importantes. O crescimento do parasita pode levar dias ou até semanas, o que retarda o diagnóstico e dificulta o início do tratamento (CASTELLI et al., 2023; PAUN, 2022). Além disso, em casos de infecção com baixo número de parasitas, a sensibilidade do método tende a ser reduzida, podendo resultar em culturas negativas mesmo quando há infecção confirmada por outros métodos (THAKUR et al., 2020). Fatores como temperatura, esterilidade do material, tempo de transporte e composição do meio influenciam diretamente a viabilidade do parasita e o sucesso do isolamento. Soma-se a isso a elevada suscetibilidade do cultivo à contaminação bacteriana e fúngica, que pode competir por nutrientes, alterar o pH e inviabilizar completamente o crescimento das formas promastigotas, representando uma das principais causas de falha em tentativas de cultivo em laboratórios de rotina (MELLO, 2009).

Ainda, o ambiente de cultura pode selecionar subpopulações adaptadas às

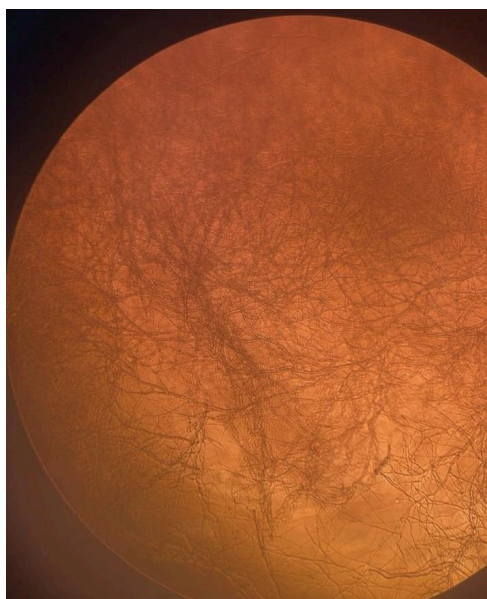
condições *in vitro*, o que pode alterar características morfológicas e fisiológicas do parasita, limitando a representatividade desses isolados em relação ao comportamento *in vivo* (CARDOSO et al., 2019; CASTELLI et al., 2023).

Figura 13 - Contaminação por fungo em uma garrafa de cultura



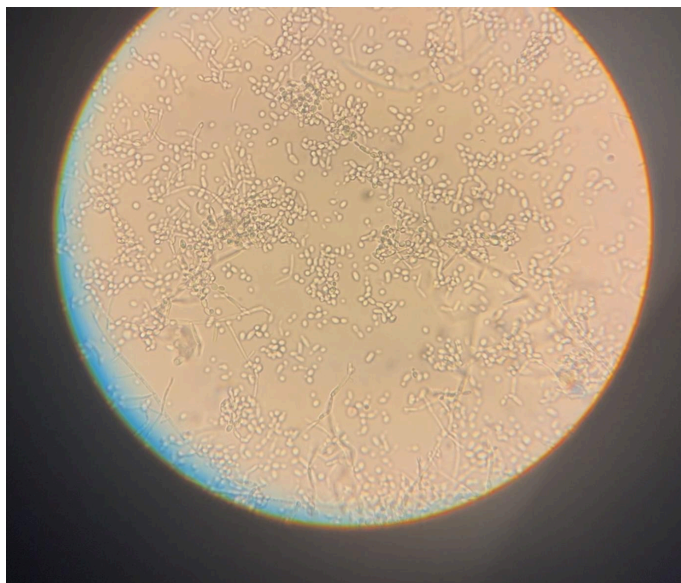
Fonte: Imagem da autora (2025)

Figura 14 - Contaminação de cultura com fungo (hifas)



Fonte: Imagem da autora (2025)

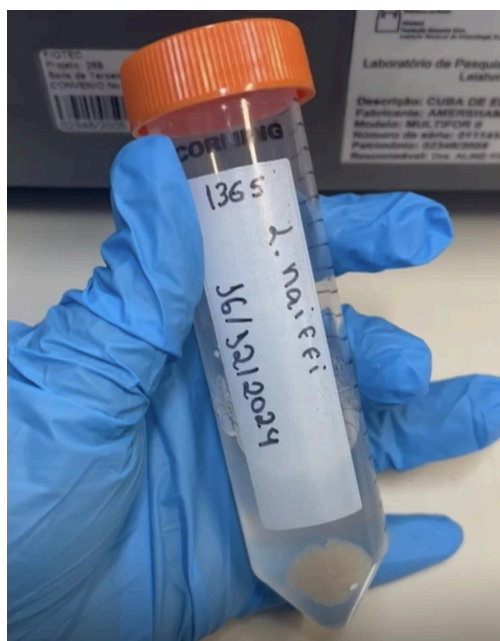
Figura 15 - Contaminação de cultura com fungo (hifas e leveduras)



Fonte: Imagem da autora (2025)

As principais vantagens do isolamento de *Leishmania* em cultivo *in vitro* é a confirmação da presença do agente etiológico, possibilitando, inclusive, a posterior identificação da espécie envolvida na infecção (Figuras 16 e 17).

Figura 16 - Massa parasitária para caracterização por eletroforese enzimática (MLEE)



Fonte: Autoria própria (2025)

Figura 17 - Isolados de Leishmania spp. criopreservados em nitrogênio líquido



Fonte: Arquivo do LaPClin VigiLeish (2025)

Este estudo tem como objetivo proporcionar uma análise sobre o desempenho do método tradicional de cultura no diagnóstico da LTA, baseada na literatura. Descrever o método, avaliar a sensibilidade, identificar vantagens e limitações, contribuindo na compreensão de sua aplicabilidade prática e possíveis melhorias no contexto laboratorial.

2 METODOLOGIA

Este estudo trata-se de uma pesquisa bibliográfica, baseada em uma revisão da literatura científica para analisar e sintetizar achados relacionados ao método tradicional de cultura utilizado no diagnóstico da LTA em humanos. Esse estudo visa avaliar vantagens, limitações e aplicação prática desse método na rotina laboratorial.

O levantamento de publicações científicas foi realizado por buscas na base de dados PubMed, abrangendo estudos publicados a partir do ano 2015 nos idiomas português e inglês. Foram utilizados os seguintes descritores: *american cutaneous leishmaniasis*; *traditional method of culture*; *diagnosis*; e correspondentes em português.

A seleção dos artigos seguiu os critérios de inclusão relacionados à relevância para o tema, data de publicação, idioma e tipo de estudo. Foram excluídos trabalhos duplicados, editoriais, cartas ao editor, resumos sem acesso ao texto completo e artigos que não abordam diretamente o método de cultura no

diagnóstico da LTA.

3 RESULTADOS

Com base nos critérios de inclusão, foram selecionados 4 artigos para análise e discussão nesse trabalho:

3.1 Artigo 1: Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis (RASTI et al., 2016)

Nesse estudo o objetivo principal foi comparar o desempenho de diferentes métodos laboratoriais, o exame direto, a cultura e técnicas moleculares, para o diagnóstico da leishmaniose cutânea em pacientes atendidos em regiões endêmicas do Irã. A amostragem foi composta por 130 pacientes com suspeita clínica de leishmaniose tegumentar, apresentando lesões ulceradas de diferentes durações e localizações.

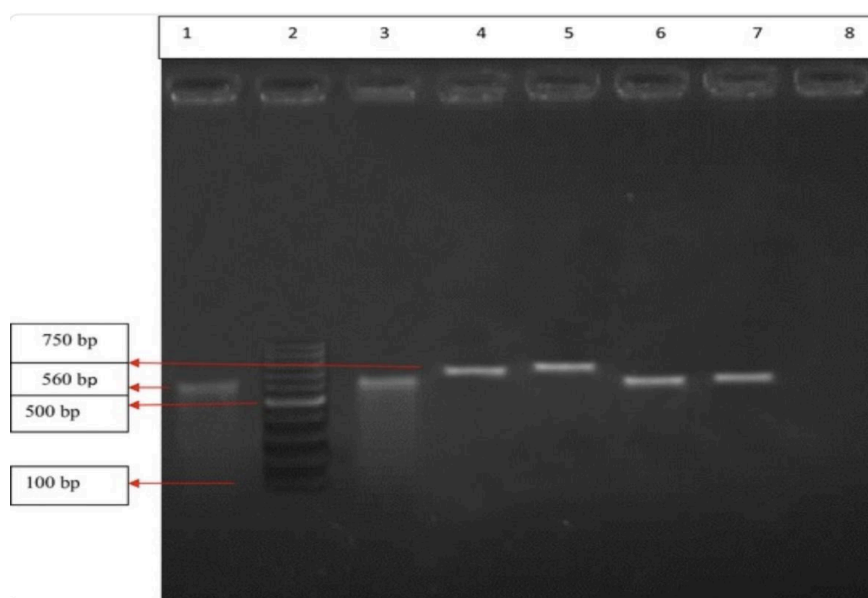
A coleta do material biológico foi realizada por aspiração da borda ativa das lesões com seringa estéril contendo pequena quantidade de solução salina estéril. Após a coleta, o aspirado foi dividido em três partes, destinadas respectivamente ao exame direto, cultivo *in vitro* e análise molecular.

Para o exame direto, o material foi espalhado cuidadosamente sobre lâminas de vidro limpas, formando esfregaços finos. As lâminas foram secas ao ar, fixadas com metanol e posteriormente coradas pelo corante Giemsa. Em seguida, foram analisadas ao microscópio óptico em objetiva de imersão (100x) para detecção de formas amastigotas do parasito dentro de macrófagos. A observação de pelo menos uma amastigota foi suficiente para classificar a amostra como positiva. Esse método, apesar de rápido e de baixo custo, mostrou-se limitado em casos de infecções com baixa carga parasitária.

O cultivo parasitológico foi realizado em meio bifásico NNN, composto por uma fase sólida à base de sangue e uma fase líquida suplementada com meio RPMI-1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino e antibióticos (geralmente penicilina e estreptomicina) para prevenir contaminações bacterianas. Cada tubo de cultura recebeu uma alíquota do aspirado da lesão e foi mantido em estufa tipo BOD a 25°C por um período de até 30 dias. Durante esse tempo, as culturas foram inspecionadas diariamente ao microscópio para verificar o aparecimento de formas promastigotas móveis. A presença dessas formas flageladas foi considerada um resultado positivo para *Leishmania*.

Paralelamente, o DNA genômico foi extraído de parte do aspirado utilizando o kit comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). A amplificação foi realizada por PCR convencional e nested-PCR, ambas direcionadas à região de DNA cinetoplasto (kDNA), que apresenta um alto número de sequências repetitivas de DNA, o que o torna um bom alvo para o diagnóstico do gênero *Leishmania*. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e observado sob luz UV (figura 18).

Figura 18 - Eletroforese em gel de agarose com os produtos de amplificação por nested-PCR



Fonte: RASTI *et al.*, 2016

Os resultados (tabela 1) indicaram que a PCR convencional e a nested-PCR com o alvo do kDNA apresentaram as maiores taxas de detecção (75,4% e 73,8%, respectivamente), enquanto o exame direto obteve positividade de 66,9% e a cultura, de apenas 56,2%. Apesar da baixa sensibilidade, a cultura demonstrou especificidade e valor preditivo positivo de 100%, confirmando que o isolamento do parasita continua sendo o método mais confiável quando positivo (tabela 2). No entanto, o tempo prolongado de crescimento, a baixa taxa de positividade e a necessidade de condições laboratoriais controladas foram apontados como limitações significativas, especialmente em áreas endêmicas com infraestrutura limitada.

Tabela 1 - Frequência de positivos em cada método de diagnóstico

Ensaio	Positivo (%)	Negativo (%)
Microscopia	66,9% (87/130)	33,1% (43/130)
Cultura	56,2% (72/130)	43,8% (58/130)
PCR convencional kDNA	75,4% (98/130)	24,6% (32/130)
Nested-PCR kDNA	73,8% (96/130)	26,2% (34/130)
Microscopia + PCR convencional kDNA	76,2% (99/130)	23,8% (31/130)

Fonte: Adaptado de RASTI *et al.*, 2016

Tabela 2 - Eficiência dos métodos de diagnóstico

Ensaio	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
Microscopia	87,9	100	100	72,1
Cultura	72,7	100	100	53,4
PCR convencional kDNA	99	100	100	96,9
Nested-PCR kDNA	97	100	100	91,2

Fonte: Adaptado de RASTI *et al.*, 2016

*Legenda: VPP-valor preditivo positivo/ VPN- valor preditivo negativo

3.2 Artigo 2: A Novel Non-Invasive Diagnostic Sampling Technique for Cutaneous Leishmaniasis (TASLIMI *et al.*, 2017).

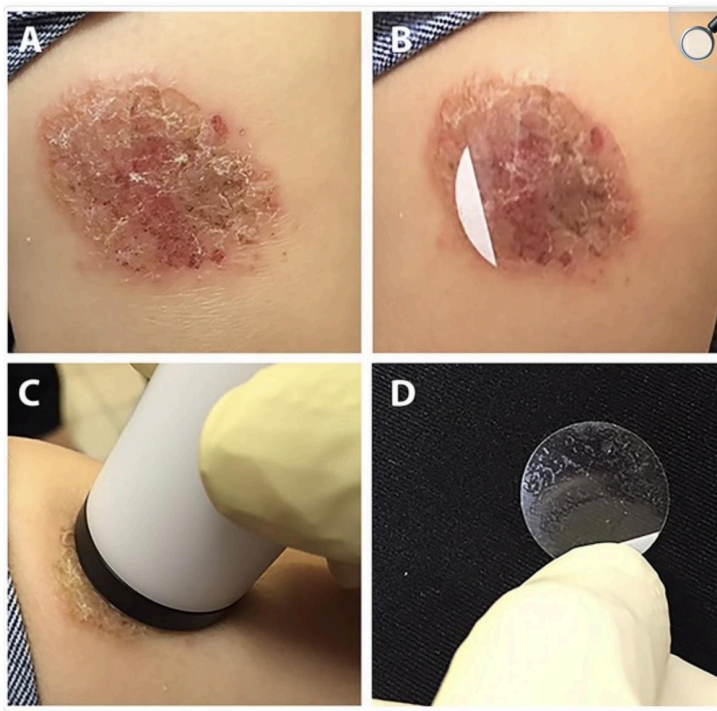
Esse estudo teve como proposta introduzir e validar uma nova abordagem de coleta não invasiva de amostras para diagnóstico da leishmaniose cutânea, buscando superar as limitações dos métodos tradicionais de coleta e diagnóstico,

que são dolorosos, exigem equipe treinada e podem falhar em amostras com poucos parasitos.

O estudo foi conduzido no Irã, com pacientes encaminhados ao Skin Center of Razi Hospital, em Teerã, e ao Emam Reza Hospital, em Mashhad. Ao todo, 119 pacientes com lesões compatíveis com leishmaniose cutânea tiveram o diagnóstico confirmado por microscopia de esfregaços corados por Giemsa. O estudo comparou tanto os métodos diagnósticos (cultura vs. PCR) quanto os tipos de coleta (biópsia invasiva vs. fita adesiva não invasiva).

Os pesquisadores avaliaram um método inovador chamado *tape stripping* (figura 19), que consiste na aplicação direta de fitas adesivas transparentes sobre a lesão cutânea ativa. As áreas afetadas foram limpas com solução fisiológica estéril e deixadas secar naturalmente. Em seguida, fitas adesivas esterilizadas (tipo *Scotch tape*) foram pressionadas levemente sobre a região central e periférica da lesão durante alguns segundos e, logo após, retiradas com cuidado. Cada fita foi fixada sobre uma lâmina de vidro estéril, de forma a preservar o material celular e exsudato aderidos.

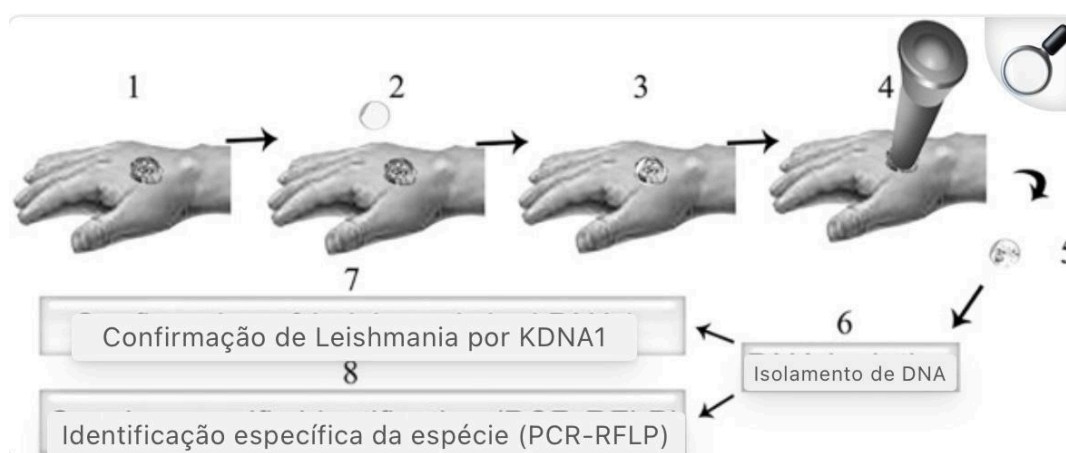
Figura 19 - Ilustração da coleção de amostras usando disco de fita



Fonte: TASLIMI et al., 2017

O material coletado foi submetido à extração de DNA utilizando o kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). O DNA foi amplificado por PCR convencional e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), utilizando *primers* específicos para a detecção de *Leishmania major* e *Leishmania tropica*, espécies predominantes na região estudada (Figura 20). Os resultados obtidos por PCR foram comparados com dois métodos convencionais: exame direto e cultura, realizados com amostras obtidas por aspiração da lesão.

Figura 20 - Ilustração esquemática do uso de disco de fita, isolamento de DNA e identificação de espécies



Fonte: Adaptado TASLIMI *et al.*, 2017

*Legenda: 1) lesão do paciente; 2) disco; 3) disco aplicado à lesão do paciente; 4) pressão uniforme aplicada à lesão usando um êmbolo; 5) remoção estéril do disco da lesão; 6) isolamento de DNA do disco; 7) confirmação de *Leishmania* por kDNA1; 8) identificação específica da espécie (PCR-ITS-RFLP).

A cultura foi realizada em meio bifásico NNN, suplementado com meio *Schneider's Drosophila medium* (Sigma, Darmstadt, Germany), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 40 mM HEPES 2 mM, 0,1 mM adenosine, 2 mM L-glutamina, 0.5µg/mL hemina e 50 µg/mL de gentamicina. As culturas foram incubadas a 26°C e examinadas por até 4 semanas. Como esperado, o crescimento de promastigotas móveis confirmou a positividade das culturas. No entanto, o tempo de incubação prolongado, a taxa variável de crescimento e a necessidade de manutenção rigorosa de esterilidade foram destacados como pontos críticos do método.

Os resultados mostraram que a técnica com fitas adesivas apresentou desempenho diagnóstico satisfatório, com sensibilidade e especificidade comparáveis à PCR realizada com amostras invasivas, além de vantagens adicionais como rapidez, menor risco de contaminação e ausência de dor ou desconforto para o paciente. O método demonstrou potencial para ser aplicado em áreas endêmicas com poucos recursos laboratoriais, facilitando o diagnóstico e a vigilância epidemiológica.

De forma geral, o protocolo proposto por Taslimi et al. representa uma alternativa eficiente e prática ao método tradicional de cultura, reduzindo a dependência de infraestrutura complexa e tempo de incubação prolongado, ao mesmo tempo em que mantém elevada acurácia diagnóstica (Tabela 3).

Tabela 3 - Precisão diagnóstica da cultura a partir de biópsia e disco de fita

Tipo de amostra	TP	FP	FN	TN	Sensibilidade (IC 95%)
Cultura de biópsia	16	0	15	0	51% (33% - 69%)
Disco de fita adesiva	31	0	0	0	100%

Fonte: Adaptado de TASLIMI et al., 2017

*Legenda: (TP, verdadeiro positivo; FP, falso positivo; FN, falso negativo; TN, verdadeiro negativo; IC, intervalo de confiança)

3.3 Artigo 3: Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods (REIMÃO et al., 2020)

Esse estudo teve como objetivo analisar de forma crítica os métodos laboratoriais empregados no diagnóstico da leishmaniose tegumentar e visceral, em diversos países, incluindo técnicas tradicionais, moleculares e imunológicas, bem como discutir suas vantagens e limitações em contextos clínicos e epidemiológicos diversos (Tabela 4). A revisão detalhou que o diagnóstico tradicional envolve principalmente o exame microscópico direto de amostras clínicas, como esfregaços de lesões cutâneas ou aspirados linfáticos. Para o exame direto, as amostras são coradas pelo método de Giemsa, permitindo a visualização de formas amastigotas

do parasita dentro de macrófagos. O estudo reforça que, embora rápido e de baixo custo, este método apresenta sensibilidade reduzida em casos de infecção com baixa carga parasitária, o que limita seu desempenho em determinadas situações clínicas.

Tabela 4 - Resumo dos principais métodos utilizados para o diagnóstico de Leishmaniose Cutânea e Leishmaniose Visceral

Método	Forma clínica (LC/LV)	Amostra	Deteção	Cultura necessária ?	Discriminação de espécies	Vantagens	Limitações
Exame direto	LC principalmente ; pode ser usado em LV em amostras apropriadas]	Raspado da lesão, esfregaços	Visualização de amastigotas por microscopia	Não	Não	Rápido, barato, disponível em rotina, alta especificidade quando positivo	Sensibilidade variável (diminui em lesões antigas); não identifica espécie.
Imprint	LC	Fragmento de biópsia	Visualização de amastigotas	Não	Não	Bom para uso com biópsias; técnica simples	Sensibilidade limitada; dependente da amostra
Exame microscópico	LV	Aspirado de medula óssea, baço, sangue	Visualização de amastigotas em aspirados	Não	Não	Usado no diagnóstico de VL; diagnóstico direto possível	Procedimentos invasivos; sensibilidade variável; risco em pacientes graves
Cultura <i>in vitro</i>	LC e LV	Fragmentos de lesão, aspirado	Crescimento de promastigotas em meios (ex.: NNN, Schneider)	Sim (é a cultura)	Parcialmente-permite tipagem posterior por métodos complementares	Permite isolamento para confirmação e estudos (ex.: isoenzimas, sequenciamento)	Demorado (semanas), risco de contaminação ; nem sempre disponível em rotina

Xenodiagnóstico	LC e LV (principalmente pesquisa/transmissão)	Exposição de vetores colonizados ao paciente/amostra	Flebotomíneos colonizados alimentam-se; detecção do parasito no vetor	Não (usa vetor vivo)	Parcialmente-pode ser seguido por cultura/molecular	Muito sensível para detectar parasita vivo; útil para estudos de transmissibilidade	Requer colônia de vetores, logística complexa; não prático em rotina
Inoculação em animais	LC e LV	Fragmentos de lesão, aspirado	Inoculação do parasita em animal para desenvolvimento de infecção	Não (gera isolamento vivo)	Parcialmente-possibilita tipagem posterior	Alta sensibilidade para demonstrar parasita vivo	Questões éticas, tempo, custo; não é rotina
PCR	LC e LV	Lesão, aspirado, sangue	Amplificação de DNA do parasita	Não	Sim- quando alvos e sequenciamento são usados	Alta sensibilidade e especificidade; detecta baixa carga parasitária	Requer infraestrutura molecular; necessidade de padronização; risco de contaminação
qPCR	LC e LV	Lesão, aspirado, sangue	Quantificação da carga parasitária por amplificação em tempo real	Não	Sim- pode diferenciar com alvos específicos	Alta sensibilidade; quantificação	Custo e equipamento; controles rigorosos necessários
LAMP	LC e LV	Lesão, aspirado, sangue	Amplificação isotermica do DNA do parasita	Não	Parcialmente-depender do ensaio	Rápido; potencial para uso em campo; pouca infraestrutura	Padronização/validação ainda em desenvolvimento; desempenho variável

MLEE	LC, LV	Cultura	Perfis isoenzimáticos por eletroforese	Sim	Sim- permite discriminar espécies e estudar variabilidade	Alta capacidade de discriminação entre zimodemas; útil para estudos populacionais e investigação epidemiológica	Exige cultura viável, longa duração, técnicas laboratoriais complexas; pouca aplicabilidade para rotina diagnóstica.
PCR-RFLP	LC, LV	Lesão, sangue, cultura	PCR+ digestão enzimática do DNA	Não	Sim – permite discriminar espécies e estudar variabilidade	Boa para discriminar espécies e variantes genéticas; metodologia relativamente acessível e reprodutível.	Dependência da escolha adequada do gene-alvo e das enzimas de restrição; risco de contaminação ; exige infraestrutura molecular.
Sequenciamento de DNA (sanger/NGS)	LC e LV	Produtos de qPCR, amostras, isolados	Sequenciamento de regiões alvo para tipagem/ caracterização de espécies	Não (pode usar PCR direto)	Sim- permite discriminar espécies e estudar variabilidade	Excelente para tipagem e investigação epidemiológica	Custo, necessidade de bioinformática e expertise
Elisa	LV; limitado em LC	Soro, sangue (alguns estudos: urina)	Deteção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	Não	Não	Útil para VL; testes rK39 amplamente usados (diagnóstico rápido)	Sensibilidade/ especificidade variáveis; cross-reactivity; pouco útil em CL e em imunossuprimidos

Western Blot	LV (LC em estudos)	Soro (alguns estudos: urina)	Deteção de padrões de anticorpos	Não	Não- usa para diagnóstico	Alta sensibilidade e especificidade; detalha resposta humoral	Demorado, caro; exige pessoal qualificado
--------------	--------------------	------------------------------	----------------------------------	-----	---------------------------	---	---

Fonte: Adaptado de REIMÃO *et al.*, 2020

*Legenda: LC: Leishmaniose Cutânea/ LV: Leishmaniose Visceral/ LAMP: Amplificação isotérmica mediada por loop / PCR: Reação em cadeia da polimerase / RFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição/ MLEE: Eletroforese de Enzimas Multilocus/ qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

No que se refere à cultura, Reimão *et al.* (2020) destacam que a técnica consiste na inoculação de material clínico em meios específicos, como os bifásicos NNN, compostos por uma fase sólida à base de sangue e uma fase líquida enriquecida com RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino e antibióticos (penicilina e estreptomicina) para prevenir contaminações fúngicas e bacterianas. As culturas são mantidas em incubadoras a 25°C e inspecionadas regularmente para o aparecimento de formas promastigotas móveis, geralmente observadas entre 7 e 30 dias após a inoculação. Embora o tempo prolongado e a necessidade de condições controladas sejam desvantagens, a cultura permite a obtenção de isolados viáveis, essenciais para caracterização genética, análise da variabilidade entre cepas, estudos de resistência medicamentosa e avaliação da resposta a novos fármacos.

Além disso, o estudo abordou métodos moleculares, destacando a PCR convencional e a nested-PCR direcionadas ao DNA do cinetoplasto (kDNA), alvo bastante utilizado no diagnóstico molecular do gênero *Leishmania*. Esses métodos permitiram detecção mais sensível do parasito, incluindo casos com baixa carga parasitária que poderiam ser negativos por exame direto ou cultura. Técnicas imunológicas, como ELISA e testes rápidos, foram discutidas como ferramentas complementares, oferecendo rapidez e aplicabilidade em áreas endêmicas, mas sem fornecer parasitos viáveis para estudos experimentais. Os resultados indicaram que, embora as técnicas moleculares apresentem maior sensibilidade, a cultura permanece insubstituível quando se busca isolamento de parasitas vivos, permitindo

estudos detalhados sobre biologia, genética, resistência a medicamentos e evolução do parasito.

Em síntese, Reimão *et al.* (2020) enfatizam que a integração de abordagens tradicionais e modernas proporciona um diagnóstico mais confiável e abrangente. A cultura mantém um papel central na pesquisa científica, especialmente por permitir a obtenção de parasitas isolados viáveis para estudos de diversidade genética, análise de mecanismos de resistência e testes de suscetibilidade a fármacos, aspectos que não podem ser acessados por métodos exclusivamente moleculares ou imunológicos. Assim, apesar de mais demorada, a cultura continua sendo um método valioso para diagnóstico confirmatório e pesquisas avançadas, sendo particularmente relevante em programas de vigilância epidemiológica e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

3.4 Artigo 4: Culture of Cutaneous Leishmania from Skin Biopsy Specimens (PAUN, 2022)

Os autores descreveram um protocolo detalhado para o isolamento e cultura de *Leishmania* a partir de biópsias cutâneas de pacientes com leishmaniose tegumentar, com o objetivo de garantir a obtenção de parasitos viáveis para análises laboratoriais avançadas. O estudo enfatizou a coleta estéril do material clínico, seguida da homogeneização da biópsia em solução salina estéril, dividindo a amostra para cultivo e eventual análise molecular. As amostras foram inoculadas em meio bifásico enriquecido, composto por uma fase sólida à base de sangue e uma fase líquida contendo RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos (penicilina e estreptomicina) e aminoácidos essenciais para manter a viabilidade e promover a multiplicação das formas promastigotas.

As culturas foram mantidas em incubadora tipo BOD a 25°C, sendo inspecionadas diariamente para observar o surgimento de formas flageladas móveis, indicativas de resultado positivo. Paun (2022) relatou que, em amostras com baixa carga parasitária, a taxa de sucesso ainda se manteve elevada, evidenciando a robustez do protocolo. Além da observação microscópica, o estudo ressaltou a importância do isolamento para análises moleculares subsequentes, incluindo PCR e genotipagem, essenciais para caracterização da espécie, investigação de híbridos e avaliação de resistência a medicamentos.

O estudo demonstrou que, embora métodos moleculares e imunológicos sejam mais rápidos e sensíveis, eles não permitem o cultivo de parasitas vivos, limitando investigações aprofundadas sobre biologia, evolução e resistência do parasito. A cultura, por sua vez, oferece material valioso para experimentos *in vitro* e *in vivo*, monitoramento da diversidade genética, análise da suscetibilidade medicamentosa e estudo de mecanismos de adaptação do parasita ao hospedeiro. Paun (2022) concluiu que a cultura de *Leishmania* permanece insubstituível para estudos laboratoriais avançados e confirma a relevância do isolamento parasitário como ferramenta indispensável no diagnóstico confirmatório e em pesquisas de controle e desenvolvimento terapêutico da leishmaniose tegumentar.

4 DISCUSSÃO

O método tradicional de cultura, embora seja um dos procedimentos laboratoriais mais antigos utilizados no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA), continua sendo de grande relevância na rotina laboratorial e em pesquisas. Os estudos analisados evidenciam que, apesar de suas limitações, a cultura permanece um recurso indispensável para o isolamento e a manutenção de cepas de *Leishmania* em condições controladas, permitindo análises mais aprofundadas sobre o parasita e suas variações genéticas.

No estudo de Sagi *et al.* (2017), observou-se que o método de cultura, quando comparado ao exame direto e à PCR, apresentou sensibilidade relativamente inferior, resultado esperado devido à exigência de condições rigorosas de esterilidade e viabilidade do material biológico. Ainda assim, os autores destacaram que a cultura continua sendo um método altamente específico e de valor inestimável, pois possibilita a obtenção de isolados viáveis, o que nenhuma outra técnica diagnóstica proporciona. Da mesma forma, Reimão *et al.* (2020) reforçam que, embora a cultura apresente um tempo de incubação mais prolongado e maior risco de contaminação, sua aplicação é fundamental para estudos de caracterização taxonômica e de variabilidade intraespecífica dos parasitos do gênero *Leishmania*.

Outro ponto importante é que o isolamento em cultura permite o desenvolvimento de estudos genéticos e moleculares, que não são possíveis por meio de métodos parasitológicos diretos. O trabalho de Taslimi *et al.* (2017) ilustra bem essa importância ao demonstrar que, após o isolamento do parasito, é possível empregar técnicas como Método de eletroforese de enzimas Multilocus (MLEE), padrão-ouro para caracterização taxonômica de *Leishmania*, e Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP) para análise da diversidade genética entre cepas, contribuindo para o entendimento da distribuição de espécies em diferentes regiões endêmicas. Além disso, o cultivo do parasito fornece material necessário para pesquisas sobre resistência medicamentosa e resposta a novos compostos terapêuticos, algo que métodos como o exame direto e o imunodiagnóstico não permitem avaliar de forma adequada (TASLIMI *et al.*, 2017; MONCADA-DIAZ *et al.*, 2024).

Paun (2022) também enfatiza a importância do método de cultura ao padronizar protocolos de isolamento a partir de biópsias de lesões cutâneas, destacando que o sucesso do cultivo depende de fatores como a escolha do meio

de cultura, o tempo de evolução da lesão e o tempo de coleta do material. A padronização descrita pela autora, reforça a necessidade de controle técnico e de treinamento especializado, já que o método é sensível a contaminações e falhas de manipulação. Apesar dessas dificuldades, o cultivo ainda é considerado o método de referência para a obtenção de isolados, sendo essencial para estudos de biologia do parasita, caracterização fenotípica e desenvolvimento de vacinas experimentais (PAUN, 2022; DE LOS SANTOS et al., 2022).

Em contrapartida, as limitações práticas do método tradicional de cultura precisam ser reconhecidas. A baixa sensibilidade em amostras com poucos parasitas, o longo período de incubação, o custo de manutenção e a necessidade de infraestrutura adequada tornam seu uso restrito a centros de referência (REIMÃO et al., 2020). Além disso, a contaminação bacteriana e fúngica continua sendo um desafio recorrente, especialmente em regiões tropicais onde as condições ambientais favorecem o crescimento de microrganismos competidores. Contudo, avanços recentes, como o uso de meios bifásicos enriquecidos e a adição de antibióticos seletivos, têm aumentado as taxas de sucesso do isolamento (SCHUSTER & SULLIVAN, 2002).

Apesar das limitações, a cultura mantém um papel estratégico na pesquisa sobre *Leishmania*. A obtenção de isolados viáveis permite não apenas a identificação precisa da espécie, mas também o acompanhamento de possíveis alterações genéticas associadas à resistência a fármacos e à adaptação do parasito ao hospedeiro. Estudos como os de De Los Santos et al. (2022) e Bensoussan et al. (2006) demonstram que análises genotípicas baseadas em isolados de cultura foram fundamentais para a redefinição da taxonomia do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) e para a identificação de híbridos naturais, fenômenos que têm implicações diretas na resposta terapêutica e na epidemiologia da doença.

Portanto, embora métodos moleculares e imunológicos apresentem vantagens em rapidez e sensibilidade, o método tradicional de cultura continua sendo uma ferramenta indispensável no contexto da LTA. Sua principal contribuição vai além do diagnóstico: é um meio que abre possibilidades para estudos aprofundados sobre a biologia, genética, evolução e resistência medicamentosa do parasito, aspectos essenciais para o aprimoramento das estratégias de controle e tratamento da doença (DE LOS SANTOS et al., 2022).

5 CONCLUSÃO

O diagnóstico da LTA se mostra um grande desafio, devido ao seu amplo espectro de manifestações clínicas presentes. Para um tratamento rápido e eficácia terapêutica, é necessário o diagnóstico precoce da doença.

Muitos métodos moleculares se tornaram eficientes, porém geralmente são utilizados apenas em laboratórios de pesquisa, devido ao seu alto custo, a necessidade de infraestrutura adequada e profissionais devidamente capazes de realizar o método. Por esse motivo, ainda são utilizados em grande escala os métodos parasitológicos. É necessário tornar o diagnóstico mais econômico, principalmente em países pobres e em áreas endêmicas da doença.

O meio de cultura e o tipo de suplementação influenciam diretamente a sensibilidade do método, devendo ser selecionados conforme a necessidade do laboratório.

A cultura é essencial e ainda é considerada o padrão-ouro, pois permite estudos fenotípicos, estudos de mecanismos de resistência e testes de suscetibilidade a fármacos. Apesar de não ser mais considerada o melhor método para o diagnóstico isolado, é necessário seu uso na rotina laboratorial de forma combinada a outros métodos de diagnóstico.

6 REFERÊNCIAS

- ABERRA, L. et al. **Evaluation of Microcapillary Culture Method for the Isolation of *Leishmania Aethiopica* Parasites from Patients with Cutaneous Lesions in Ethiopia.** *Diagnostic and Prognostic Research*, v. 3, n. 1, p. 4, dez. 2019. Disponível em: <<https://diagnprognres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s41512-019-0051-z>>. Acesso em: 21 out. 2025.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. **A Sensitive New Microculture Method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 70, n. 3, p. 294–297, mar. 2004.
- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. **The Value of a New Microculture Method for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis by Using Bone Marrow and Peripheral Blood.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 73, n. 2, p. 276–280, ago. 2005.
- BENSOUSSAN, E. et al. **Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, abr. 2006.

BOGGILD, A. K. et al. **Optimization of Microculture and Evaluation of Miniculture for the Isolation of *Leishmania* Parasites from Cutaneous Lesions in Peru.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, n. 6, p. 847–852, dez. 2008.

CARDOSO, T. et al. ***Leishmania Braziliensis* Isolated from Disseminated Leishmaniasis Patients Downmodulate Neutrophil Function.** *Parasite Immunology*, v. 41, n. 5, p. e12620, maio 2019.

CASTELLI, G. et al. **Cultivation of Protozoa Parasites *In Vitro*: Growth Potential in Conventional Culture Media versus RPMI-PY Medium.** *Veterinary Sciences*, v. 10, n. 4, p. 252, 27 mar. 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-7381/10/4/252>>. Acesso em: 21 out. 2025.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Communications Biology*, v. 5, Art. n. 305, 2022. DOI: [10.1038/s42003-022-03240-z](https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z)

CHOW, Y. W.; PIETRANICO, R.; MUKERJI, A. **Studies of Oxygen Binding Energy to Hemoglobin Molecule.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 66, n. 4, p. 1424–1431, 27 out. 1975.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. ***Leishmanioses do continente americano.*** [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2014.

DE LOS SANTOS, M. B. et al. **Genetic Diversity and Population Structure of *Leishmania* (Viannia) *Braziliensis* in the Peruvian Jungle.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 16, n. 5, p. e0010374, maio 2022.

DE OLIVEIRA FILHO, V. A. et al. **An Overview of *Leishmania* *In Vitro* Cultivation and Implications for Antileishmanial Screenings against Promastigotes.** *Parasitologia*, v. 4, n. 4, p. 305–318, 2 out. 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2673-6772/4/4/27>>. Acesso em: 16 out. 2025.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. D. L. R. D. **Leishmaniose tegumentar americana.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71–80, jan. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822003000100011&lng=pt&tlng=pt>. Acesso em: 16 out. 2025.

GRAÇA, G. C. D. et al. **Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 107, n. 5, p. 664–674, ago. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762012000500014&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 16 out. 2025.

JAHROMI, A. S.; JOKAR, M.; ABDOUS, A.; SOLEIMANPOUR, S.; RAHMANIAN, K.; ASKARI, H.; RAHMANIAN, V. **Knowledge, attitudes, and practices toward cutaneous leishmaniasis as a neglected tropical disease among the general population: a systematic review and meta-analysis.** *Discover Global Health*, v. 15, p. 97, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s44197-025-00444-4>

MELLO, Cíntia Xavier de. **Otimização do preparo de meio de cultura Schneider® para o isolamento de Leishmania sp.** 2009. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.

MIRANDA, J. C. et al. **Frequency of Infection of Lutzomyia Phlebotomines with Leishmania braziliensis in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 2, p. 185–188, mar. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000200006&lng=en&tling=en>. Acesso em: 16 out. 2025.

MONCADA-DIAZ, M. J. et al. **Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Leishmania spp.** *Pathogens (Basel, Switzerland)*, v. 13, n. 10, p. 835, 27 set. 2024. DOI: [10.3390/pathogens13100835](https://doi.org/10.3390/pathogens13100835)

Organização Mundial da Saúde (WHO). **Leishmaniasis: Epidemiological aspects and vector control.** Geneva: World Health Organization, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: 22 out. 2025.

PAGHEH, A. et al. **An Improved Microculture Method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.** *Journal of Parasitic Diseases*, v. 38, n. 4, p. 347–351, dez. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12639-013-0316-3>>. Acesso em: 21 out. 2025.

PAUN, A. **Culture of Cutaneous Leishmania from Skin Biopsy Specimens.** *Current Protocols*, v. 2, n. 2, p. e367, fev. 2022. DOI: [10.1002/cpz1.367](https://doi.org/10.1002/cpz1.367)

RASTI, S. et al. **Comparison of Molecular, Microscopic, and Culture Methods for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 30, n. 5, p. 610–615, set. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.21910>>. Acesso em: 21 out. 2025.

REIMÃO, J. Q. et al. **Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis: Current and Future Methods.** *Microorganisms*, v. 8, n. 11, p. 1632, 22 out. 2020.

SAGI, O. et al. **Sensitive Molecular Diagnostics for Cutaneous Leishmaniasis.** *Open Forum Infectious Diseases*, v. 4, n. 2, p. ofx037, 2017.

SALGUEIRO, M. M. et al. **Parasite Species Variation and Impact of Spatial Displacement of the Population on Cutaneous Leishmaniasis in Rio de Janeiro,**

Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 116, n. 1, p. 70–79, 20 jan. 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article/116/1/70/6298661>>. Acesso em: 16 out. 2025.

SAÚDE, M. da. **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar.** [s.l.] Ms, 2016.

SCHUSTER, F. L.; SULLIVAN, J. J. **Cultivation of Clinically Significant Hemoflagellates.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 3, p. 374–389, jul. 2002. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.15.3.374-389.2002>>. Acesso em: 16 out. 2025.

TASLIMI, Y. et al. **A Novel Non-Invasive Diagnostic Sampling Technique for Cutaneous Leishmaniasis.** *PLoS neglected tropical diseases*, v. 11, n. 7, p. e0005750, jul. 2017.

THAKUR, S.; JOSHI, J.; KAUR, S. **Leishmaniasis Diagnosis: An Update on the Use of Parasitological, Immunological and Molecular Methods.** *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology*, v. 44, n. 2, p. 253–272, jun. 2020.