

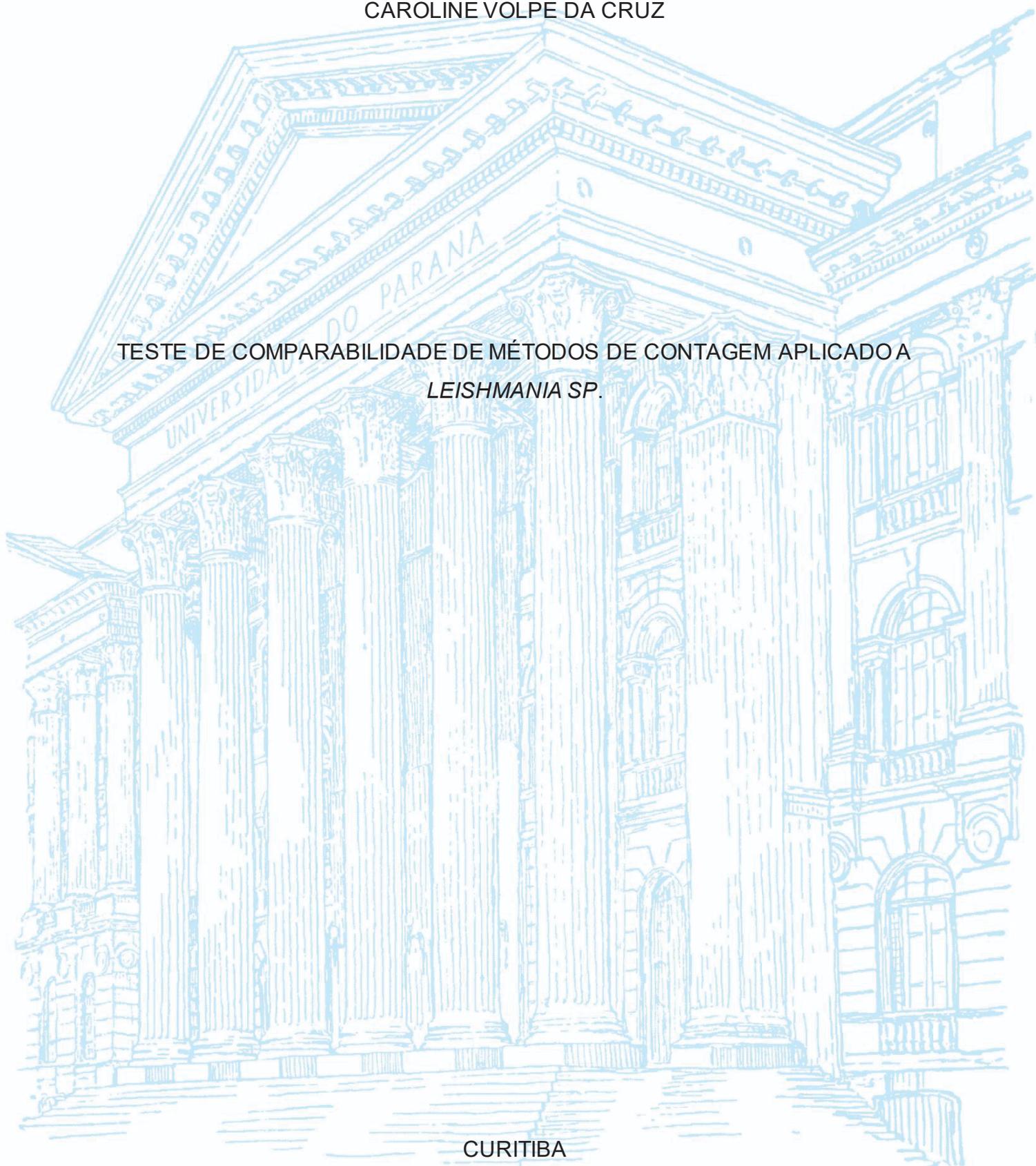
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE VOLPE DA CRUZ

TESTE DE COMPARABILIDADE DE MÉTODOS DE CONTAGEM APLICADO A
LEISHMANIA SP.

CURITIBA

2021



CAROLINE VOLPE DA CRUZ

TESTE DE COMPARABILIDADE DE MÉTODOS DE CONTAGEM APLICADO A
LEISHMANIA SP.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de bacharelado em Farmácia da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Thaís Martins Guimarães

CURITIBA

2021

RESUMO

A *Leishmania* é um protozoário causador da Leishmaniose, ela é uma doença tropical negligenciada com áreas endêmicas no Brasil. Ela pode se apresentar de duas formas dependendo do parasita em questão e é dividida em Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), ambas as formas possuem casos no Brasil, sendo mais prevalentes na região Norte e Nordeste. Desta maneira, o diagnóstico desta doença é de extrema importância. Em regiões mais afastadas a Intradermoreação (IDRM) é uma saída de baixo custo e baixa tecnologia para o diagnóstico. Este trabalho teve como objetivo avaliar e definir um método de determinação da concentração celular, comparando resultados obtidos por contagem em câmara de Neubauer e de densidade óptica (DO) no espectrofotômetro. A possível troca do método de quantificação de formas promastigotas/mL diminuirá intercorrências relacionadas a acuidade visual, conhecimento e cansaço do operador. A leitura da DO demonstrou ser linear quando comparada à concentração de células. Novos testes poderão ser realizados para validar a leitura da DO no processo de fabricação do antígeno de Montenegro.

Palavras-Chave: Leishmania; Densidade Óptica; Contagem em Câmara.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
1.1 LEISHMANIOSE	5
1.2 LEISHMANIA SP.	7
1.3 DIAGNÓSTICO	9
1.4 PRODUÇÃO DO ANTÍGENO DE MONTENEGRO	11
1.5 DENSIDADE ÓPTICA	12
1.6 PROCESSO DE VALIDAÇÃO	12
1.7 JUSTIFICATIVA	12
1.8 OBJETIVOS	12
2 MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1 CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO	13
2.2 PREPARO DAS DILUIÇÕES	13
2.3 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER	14
2.4 LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER	15
3.2 LEITURA DE DENSIDADE ÓPTICA	15
3.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS	16
4 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas. Esta doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*. É uma doença que é dividida em dois, de acordo com o tipo de parasita que causou. O primeiro tipo de leishmaniose é a tegumentar (LT) que é causada por parasitas que possuem tropismo por pele e mucosas e a leishmaniose visceral (LV) que são causadas por aqueles que possuem tropismo por órgãos do sistema reticuloendotelial (FARIA, 2017).

A leishmaniose é uma doença negligenciada e até os dias atuais é um grande problema de saúde pública. Moradores de regiões rurais e mais afastadas são os que mais sofrem com o agravamento da doença. Nestas áreas ocorrem falta de vigilância e dificuldade no acesso à saúde. Esta falta de diagnóstico e a subnotificação limita a determinação do real problema no país (OKWOR; UZONNA, 2016).

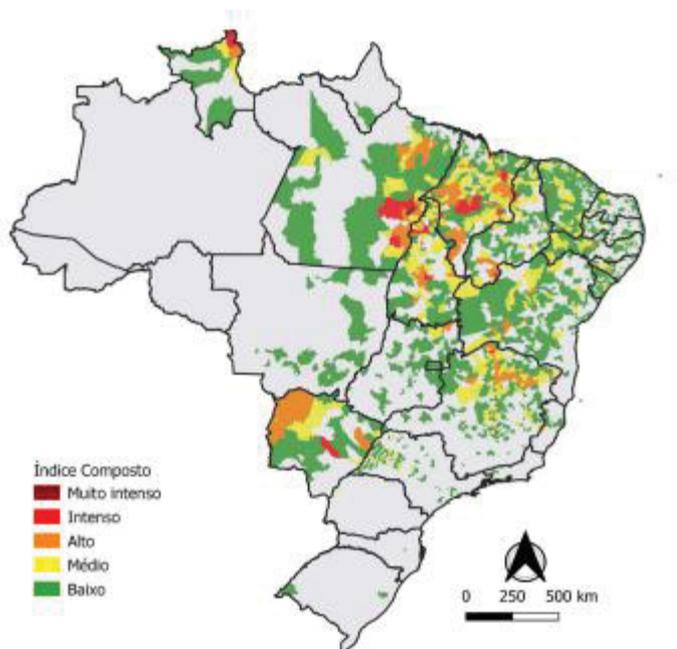
Os cães e outros animais são reservatórios do protozoário e o flebotomíneo do gênero *Lutzomyia* é um vetor da doença. Primeiramente a Leishmaniose era considerada uma zoonose, porém com as modificações que o ser humano causou no meio ambiente e adaptação dos vetores ao ambiente domiciliar passou a ser considerada uma antropozoonose (FARIA, 2017).

No artigo intitulado “Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America” estima-se que a quantidade de cães contaminados seja da ordem de milhões, a revisão dos autores aponta que assim como a Leishmaniose em humanos, a leishmaniose em cães também seja subnotificada. A prevalência de infecção é muito maior que a prevalência que desenvolve a doença. Desta forma, esses animais infectados podem servir como reservatório de infecção para os flebotomíneos (MARCONDES; DAY, 2019). Como tentativa de controle, o ministério da saúde adquiriu várias coleiras para uso em cães impregnadas com deltametrina 4% que foram distribuídas nos municípios com maior risco no ano de 2020. Outra medida adotada foi o treinamento de profissionais quanto a indicadores a serem monitorados e ações a serem realizadas em áreas endêmicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Segundo o Ministério da Saúde (2021), em 2019 foram confirmados 2.529 casos de Leishmaniose Visceral no Brasil. Estes casos estavam distribuídos em 24 Unidades Federativas de todas as cinco regiões. Segundo o boletim, a doença acomete principalmente jovens adultos, na faixa de 20 a 49 anos e do sexo masculino. Foram notificados vários casos em crianças menores de cinco anos. A letalidade do

ano de 2019 foi a maior dos últimos 10 anos, com índice por volta de 9%. A figura abaixo mostra a distribuição dos casos em todo o território brasileiro.

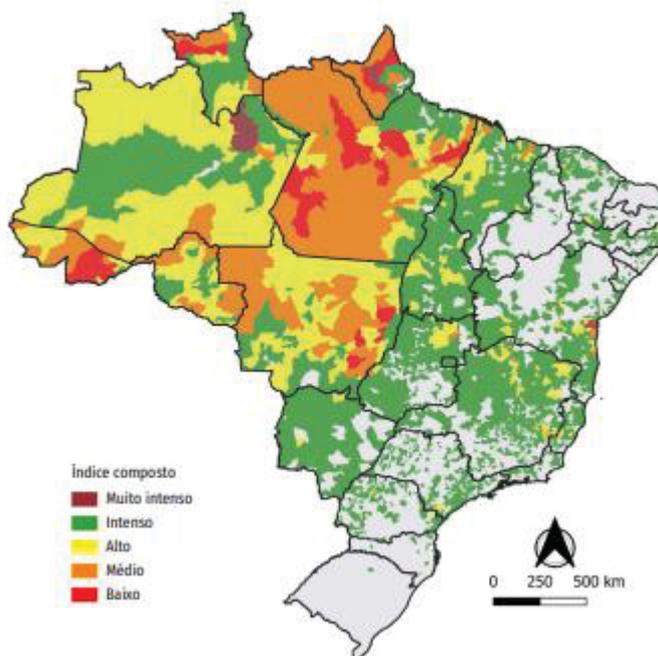
Figura 1: Estratificação de risco da leishmaniose visceral por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019.



Fonte: Ministério da saúde, 2021.

No boletim epidemiológico de doenças negligenciadas de 2021, também consta a epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar. Foram confirmados 15.484 novos casos em 2019 com coeficiente de detecção de 7,37 por 100 mil habitantes. A maior quantidade de casos confirmados foi na região norte, diferentemente da LV que foi registrada a maior quantidade de casos na região nordeste. A faixa etária que é acometida é a mesma que na LV assim como a predominância da doença no sexo masculino. Na figura 2, podemos observar que os casos de LV e LT acabam não se sobrepondo na maioria dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

Figura 2: Estratificação de risco da leishmaniose tegumentar por município de infecção. Brasil, 2017 a 2019.



Fonte: Ministério da saúde, 2021.

Sobre o impacto da doença na população, ela afeta principalmente as regiões mais pobres do país e onde o acesso à saúde é dificultado por diversos motivos. Em outros países, o custo do tratamento ultrapassa a renda familiar (OKWOR; UZONNA, 2016). No entanto, a incorporação de medicação mais recente se deu através da portaria Nº 56, de 30 de outubro de 2018, que incorporou a miltefosina para o tratamento de primeira linha da LT no âmbito do SUS, reduzindo esse custo no tratamento da doença. Apesar do paciente ainda ter que arcar com custos de transporte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

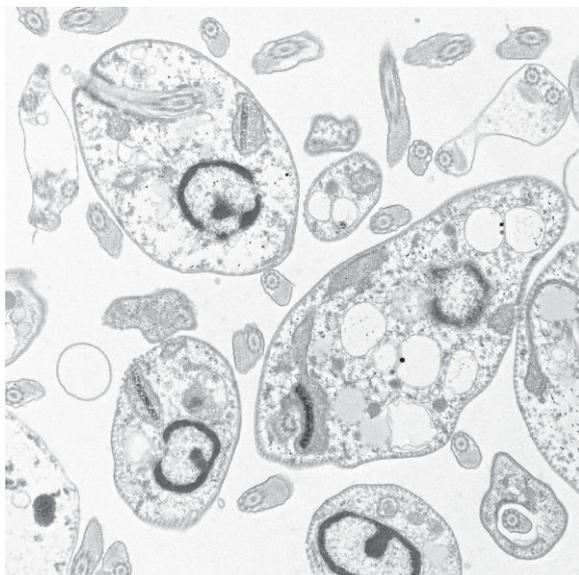
1.2 LEISHMANIA SP.

O parasita da *Leishmania* apresenta apenas duas formas evolutivas em seu ciclo de vida, a forma amastigota (figura 3) e a forma promastigota (figura 4).

A forma amastigota apresenta forma ovóide, medindo de 1 a 5 μm de comprimento por 1 a 2 μm de largura. Elas possuem um núcleo grande, um cinetoplasto proeminente e um axonema curto. Esta forma é encontrada no hospedeiro vertebrado. Já a forma promastigota é mais alongada, delgada, medindo cerca de 10 a 12 μm de comprimento. Apresentam um núcleo grande central e um cinetoplasto localizado próximo à extremidade anterior. Esta forma é encontrada no

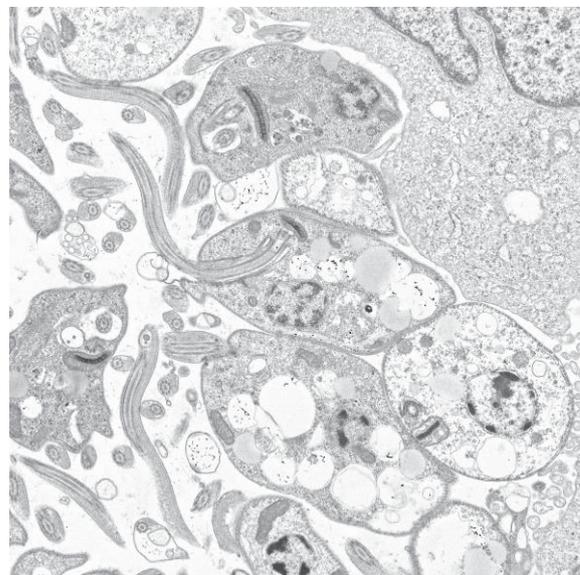
intestino do vetor e também é a forma que é cultivada em laboratórios (ENGROFF, 2021).

Figura 3: Microscopia Eletrônica da forma amastigota



Fonte: CDC, Cynthia Goldsmith e Luciana Flannery, 2017.

Figura 4: Microscopia Eletrônica da forma amastigota



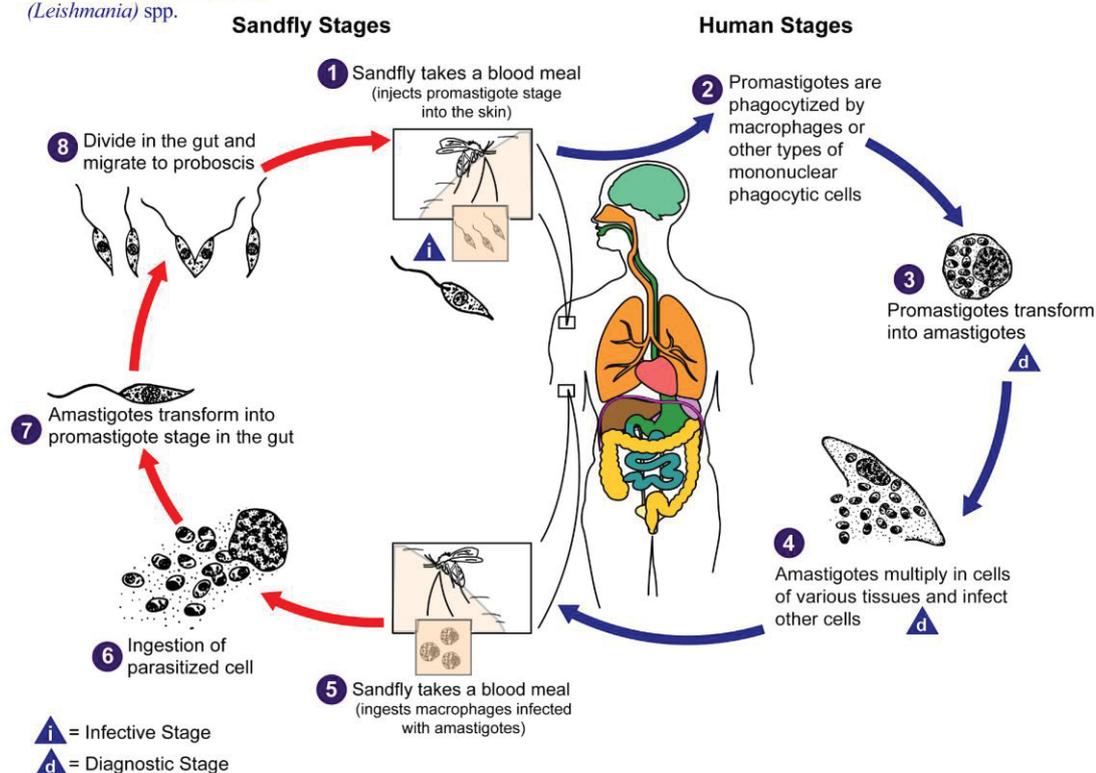
Fonte: CDC, Cynthia Goldsmith e Luciana Flannery, 2017.

A *Leishmania* apresenta ciclo heteroxeno que significa mais de um hospedeiro. Neste caso um vertebrado e outro invertebrado. A fêmea do flebotomíneo, quando ingere o sangue do animal ou ser humano contaminado, se infecta ao entrar em contato com macrófagos contendo a forma amastigota do protozoário. No intestino do invertebrado, irá ocorrer uma diferenciação para a forma promastigota e ocorre também a expansão do número de células. Esta forma do parasita é a infectante. Ao picar o hospedeiro susceptível, o flebotomíneo acaba regurgitando o conteúdo do intestino e contaminando o hospedeiro vertebrado. Por um processo de fagocitose, a forma promastigota é internalizada em macrófagos, onde se transformam novamente na forma amastigota. Desta forma se multiplica e rompe o macrófago, liberando o parasita para infectar novas células ou contaminar vetores invertebrados. Desta maneira, ocorre a manutenção do ciclo da *Leishmania* (RODRIGUES, et al, 2020). A figura 5 ilustra o ciclo de vida de modo resumido para melhor compreensão.

Figura 5: Ciclo de vida da *Leishmania*

Leishmaniasis

(*Leishmania*) spp.



Fonte: CDC, Alexander J. da Silva, 2002.

1.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico pode ser realizado baseado nos sinais e sintomas do paciente. Para caso o paciente apresente infecção inaparente, a recomendação é a realização de testes sorológicos como a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) (figura 6). São realizados testes em pacientes saudáveis porém que residem na área de transmissão da Leishmaniose. O diagnóstico diferencial é de extrema importância quando as feridas causadas pelo parasita podem ser confundidas com outras doenças como: paracoccidiodomicose, carcinoma epidermóide, carcinoma basocelular, linfomas e etc (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Figura 6: Resultado de IDRM em paciente portador de LT mucosa: resposta exacerbada com 45mm de endureção e necrose central.



Fonte: Andreia Coutinho de Faria, 2017.

Outros métodos de diagnóstico se baseiam na demonstração direta e indireta do parasita. Na identificação direta, é feito um esfregaço da biópsia da ferida onde é corado com Giemsa e neste caso pode-se identificar a forma amastigota. É recomendado que se faça a cultura do material, tomando cuidado com as contaminações (ELMAHALLAWY et al, 2014).

Segundo Elmahallawy (2014), pode ser detectado anticorpo na urina realizando o teste de aglutinação em látex. No entanto, não se trata de um teste com alta sensibilidade. Outros métodos são citados como: indirect fluorescent antibody (IFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), western blot e direct agglutination test (DAT). Os testes sorológicos possuem a desvantagem de não diferenciar uma infecção recente de uma infecção atual, visto que os anticorpos permanecem positivos após ter passado a infecção.

O método mais sensível e rápido é o método molecular. Que se baseia na amplificação e detecção do DNA da *Leishmania*. Este método permite a diferenciação entre as espécies e permite também a detecção de quantidades pequenas de antígeno. Possui a desvantagem de ser de alto custo e necessitar de infraestrutura adequada (ENGROFF, 2021).

Dentre todos os métodos de diagnóstico, a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) se destaca por não ser de alto custo e não precisar de uma grande infraestrutura. É um teste que permite o diagnóstico até nas regiões mais remotas.

Possui boa aceitação pelo paciente, podendo ser amplamente utilizado em regiões endêmicas (SILVA, 2007).

1.4 PRODUÇÃO DO ANTÍGENO DE MONTENEGRO

O Antígeno de Montenegro é uma preparação contendo a forma promastigota da *Leishmania* em uma solução conservadora de salina fenolada (PASSOS, 2004). O antígeno de Montenegro fabricado pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI) (figura 7) contém aproximadamente 10^7 promastigotas/mL. Atualmente a produção do antígeno está pausada sendo produzida apenas para pesquisa em animais. Em 2013, o CPPI era o único produtor do antígeno no Brasil (GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ, 2013).

Durante a produção, o preparo do inóculo e da contagem final de formas parasitárias são realizadas na Câmara de Neubauer. É um processo cansativo que exige muito da acuidade visual do operador. Uma alternativa para a quantificação da concentração de células é a leitura por Densidade Óptica (DO). Essa leitura é realizada no Espectrofotômetro.

Figura 7: Antígeno de Montenegro produzido pelo CPPI



Fonte: A autora, 2021

1.5 DENSIDADE ÓPTICA

Esse método tem como princípio a incidência de um feixe de radiação com uma potência conhecida e calibrada pelo equipamento que irá atravessar uma solução contendo o parasita e parte dessa potência é absorvida. A diferença entre os valores dessas potências fornece uma porcentagem de radiação absorvida. Para a maioria dos produtos químicos essa quantidade de energia absorvida é proporcional à concentração de um soluto. Essa relação é conhecida como Lei de Beer-Lambert e para ser respeitada essa lei é necessário que essa relação permaneça linear conforme aumenta a concentração da solução (GOMES, et al, 2008).

1.6 PROCESSO DE VALIDAÇÃO

O procedimento de contagem de células para a produção do Antígeno de Montenegro já foi padronizado pelo método de contagem em câmara de Neubauer. Para haver a troca de procedimento o artigo 176 da RDC 301 de 2019 prevê que alterações significativas no processo de fabricação, incluindo qualquer mudança no equipamento ou materiais, que possam afetar a qualidade do produto e/ou a reprodutibilidade do processo, devem ser validadas. Desta maneira, estudos estão sendo realizados para uma possível troca de procedimento.

1.7 JUSTIFICATIVA

Torna-se necessário definir uma metodologia confiável da determinação da concentração celular que seja um método rápido e menos cansativo para o operador durante o tempo de produção do antígeno de Montenegro.

1.8 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar e definir um método de determinação da concentração celular, comparando resultados obtidos por contagem em câmara de Neubauer e de densidade óptica no espectrofotômetro.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO

A cepa de *Leishmania brasiliensis* foi cedida pelo Instituto Carlos Chagas localizado no endereço Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775 - Cidade Industrial De Curitiba. O total doado foi de 5 mL onde foi acrescentado 5 mL de caldo BHI e 1 mL de soro fetal bovino inativado para a reativação e adaptação da cepa. O tubo falcon foi incubado em uma incubadora com agitação orbital, a uma temperatura de 25°C, 45 RPM por 3 dias.

Após os 3 dias de incubação, foi adicionado 1,5 mL do cultivo em 3 tubos falcon com capacidade de 50 mL, juntamente com 1,5 mL de soro fetal bovino inativado e 15 mL de caldo BHI. Os tubos foram novamente colocados para a incubação a 25°C, 45 RPM por 4 dias.

O próximo repique foi realizado com 15 mL de cada inóculo, no qual foi adicionado a um erlenmeyer de 500 mL (totalizando 3 erlenmeyer com o cultivo), junto com 15 mL de soro fetal bovino inativado e 150 mL de caldo BHI. Foi levado a incubação a 25°C, 45 RPM por 3 dias.

Cada erlenmeyer foi repicado para outro de capacidade de 1000 mL. As proporções foram 30 mL de inóculo, 30 mL de soro fetal bovino inativado e 300 mL de caldo BHI.

Ao final do procedimento foi notado contaminação em 2 dos 3 cultivos. Desta forma, apenas um cultivo foi lavado. Foram realizadas 2 lavagens com solução salina 0,9% (centrifugação por 10 minutos, 3.000 RPM e temperatura de 4,00 °C) a fim de obter o concentrado de célula, no qual foi ressuspendido com 25 mL.

2.2 PREPARO DAS DILUIÇÕES

Após a obtenção do concentrado inicial, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer para a realização das diluições de contagem.

Para a contagem do concentrado foi feita uma diluição de 1:100 com 5 uL de inóculo e 495 uL da solução corante (azul de metileno e fenol). Essa diluição foi contada em triplicata na câmara de Neubauer.

Com o resultado em mãos, foi realizado o preparo das diluições de forma seriada. Do inóculo inicial (concentração de 10^8), foi adicionado 9 mL de salina para 1 mL do inóculo e assim por diante. Foram preparadas 4 diluições dessa forma em triplicata obtendo as concentrações de 10^7 , 10^6 , 10^5 e 10^4 .

2.3 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

Para a contagem em câmara de Neubauer é necessária adequar as diluições de contagem. As diluições realizadas estão contidas na tabela abaixo

Tabela 1: Diluições para contagem em câmara de Neubauer.

Diluição inicial	Volume inóculo (uL)	Volume corante (uL)	Fator de diluição
10^7	5	495	1:100
10^6	50	450	1:10
10^5	50	450	1:10
10^4	250	250	1:2

Fonte: A autora, 2021.

Para obter a real concentração, os valores foram aplicados na fórmula abaixo:

$$\text{[Concentração]} = (\text{Número contado} \times \text{Fator de diluição} \times 10.000) / \text{Quadrantes contados.}$$

Em todas as diluições, foi realizada a contagem nos 4 quadrantes da câmara.

2.4 LEITURA DA DENSIDADE ÓPTICA

A leitura de densidade óptica foi feita no espectrofotômetro UV/vis. Aproximadamente 2 mL de salina foi adicionada a cubeta de vidro e feita a leitura dessa solução como branco. Foi realizada as leituras em 560 nm, 600 nm e 660 nm de cada uma das 12 diluições mais 3 leituras do concentrado de 10^8 .

Com a ajuda do programa do espectrofotômetro *UVsoftware*, foi possível a leitura com 5 casas decimais.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

A contagem em câmara de Neubauer é realizada nos quatro quadrantes das extremidades, onde se conta os leucócitos em hematologia. Os resultados obtidos estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 2: Resultados da contagem em câmara de Neubauer

Concentração Aproximada (Promastigota/mL)	Média da Contagem	Fator de Diluição	Concentração Média Calculada (Promastigota/mL)
1,00E+08	291,67	100	2,92E+08
1,00E+07	27,78	100	2,78E+07
1,00E+06	21,00	10	2,10E+06
1,00E+05	2,44	10	2,44E+05
1,00E+04	1,44	2	2,89E+04

Fonte: A autora, 2021.

3.2 LEITURA DE DENSIDADE ÓPTICA

A leitura da densidade óptica foi realizada em 3 comprimentos de onda. Os resultados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Resultados da leitura de DO

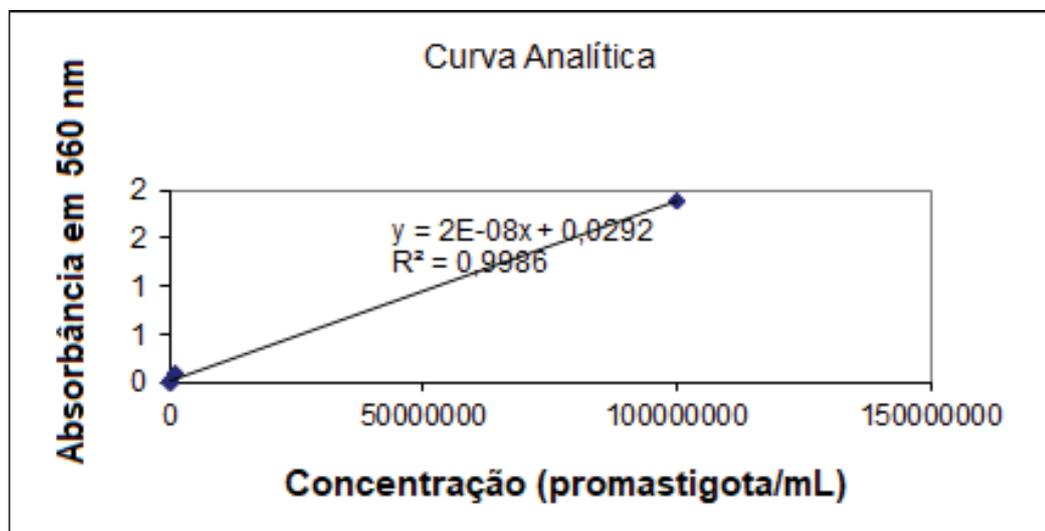
Concentração Aproximada (Promastigota/mL)	Leitura em 560 nm	Leitura em 600 nm	Leitura em 660 nm
1,00E+08	1,90077	1,88632	1,89073
1,00E+07	0,71072	0,69239	0,66221
1,00E+06	0,09727	0,09417	0,08778
1,00E+05	0,00974	0,00966	0,00858
1,00E+04	0,00196	0,00141	0,00072

Fonte: A autora, 2021.

3.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

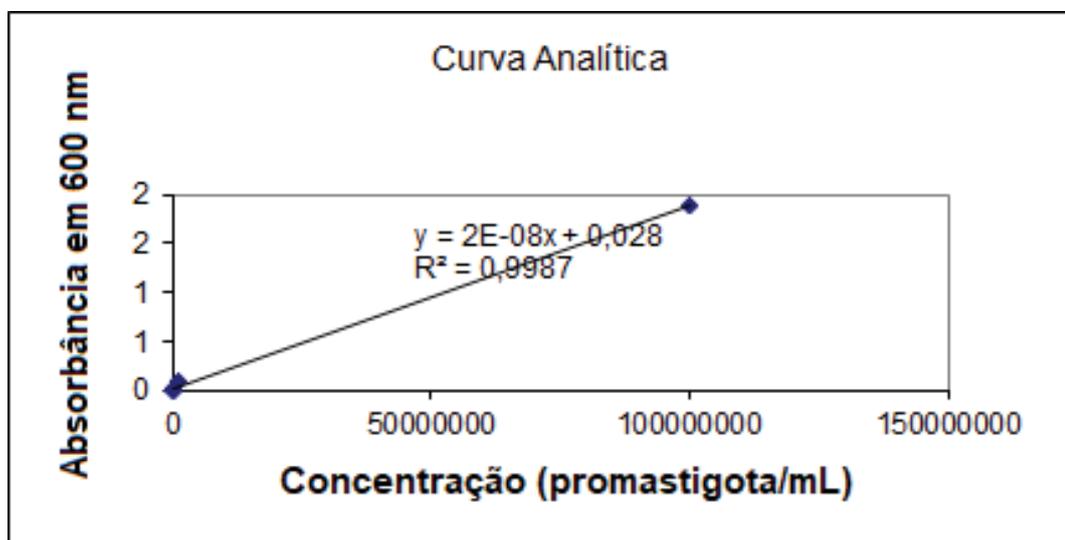
A linearidade do método foi avaliada pela planilha disponibilizada no artigo de autoria de Basílio et al, (2012). Após a inserção dos dados foram geradas curvas de calibração e o cálculo de outros parâmetros como limite de quantificação (LQ) e de detecção (LD). O artigo cita que apenas avaliar o coeficiente de correlação não é mais suficiente, porém desta forma é necessário conhecimentos estatístico mínimos para a avaliação. A avaliação dos resultados resultou na identificação de *outliers* que foram retirados da análise, os pontos identificados pertencia a concentração de 10^7 . As figuras abaixo apresentam as curvas de calibração nas concentrações de 560 nm, 600 nm e 660 nm. Todos os valores de R^2 foram significativos ($R^2 > 0,99$).

Figura 8: Curva Analítica para leitura de DO em 560 nm



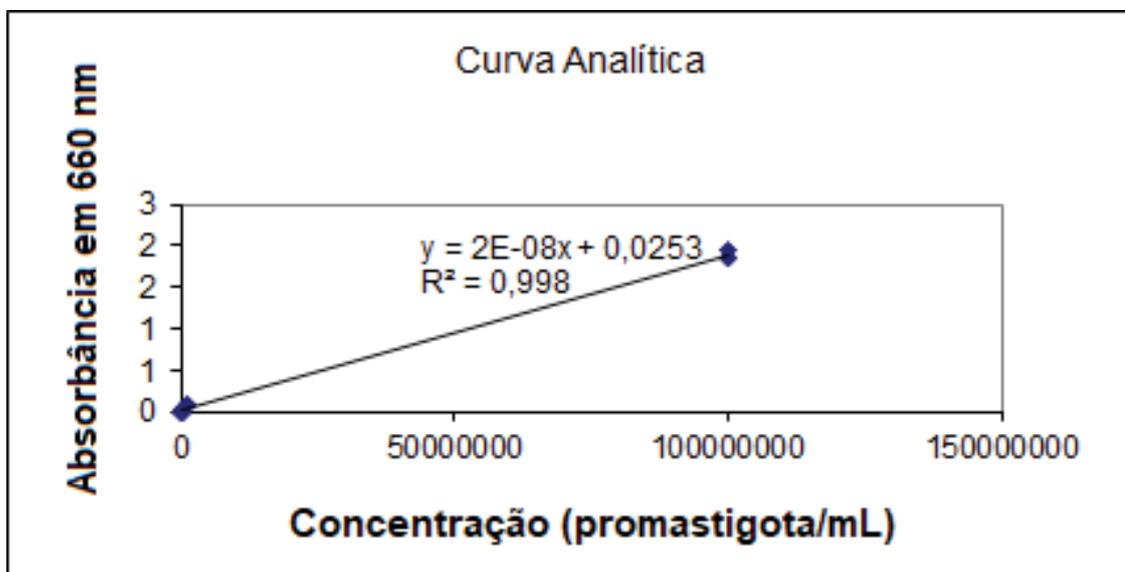
Fonte: A autora, 2021.

Figura 9: Curva Analítica para leitura de DO em 600 nm



Fonte: A autora, 2021

Figura 10: Curva Analítica para leitura de DO em 660 nm



Fonte: A autora, 2021.

No que diz respeito a melhor absorbância para leitura, todos os comprimentos de onda demonstraram boa resposta diante do teste. Apenas para concentração mais baixa (10^4) o comprimento de onda de 660 nm não demonstrou possuir boa resposta na leitura. A escolha do comprimento de onda para a leitura deverá ser avaliado e validado diante do processo de produção.

Os limites de quantificação e de detecção foram bem similares para todos os comprimentos de onda e estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Limites de Detecção e de Quantificação para cada comprimento de onda.

Comprimento de onda	Limite de Detecção (LD)	Limite de Quantificação (LQ)
560 nm	4,15E+06	1,24E+07
600 nm	4,03E+06	1,21E+07
660 nm	4,91E+06	1,47E+07

Fonte: A autora, 2021.

Estudos estatísticos mais aprofundados devem ser realizados para elaboração de um fator de conversão. A leitura de densidade óptica demonstrou ser uma boa alternativa diante da leitura em câmara de Neubauer pela curva analítica ser linear.

4 CONCLUSÃO

A nova metodologia de leitura de concentração celular diminui a possibilidade de erros de leitura relacionado a baixa acuidade visual do operador, assim como cansaço e equipamentos com falta de manutenção.

O experimento demonstrou resultados positivos para a leitura de Densidade Óptica. A curva de calibração apresentou resultados lineares segundo Bazílio (2012). Desta forma, há indícios da correlação entre a leitura em câmara de Neubauer e da DO. Sugere-se aprofundar em mais testes entre as concentrações de 10^5 e de 10^{10} por se tratar da faixa de trabalho utilizado durante a produção do Antígeno de Montenegro. Também é sugerido a elaboração de um fator de conversão devido a absorbância lida no espectrofotômetro ser um número absoluto. É importante ressaltar a importância do conhecimento em estatística para a interpretação dos resultados e também do conhecimento de *softwares* para a compilação dos resultados.

REFERÊNCIAS

ANVISA. MINISTÉRIO DA SAÚDE. RDC Nº 301 de 21 de agosto de 2019. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais de Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 21 de agosto de 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-301-de-21-de-agosto-de-2019-211914064>>. Acesso em: 02 nov. 2021.

BASÍLIO, F. S. et al. Uso de planilha eletrônica na verificação da adequação de curva analítica ao modelo linear. **Analytica**. São Paulo, v. 10, n. 59, p. 60-67, 2012. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9141/2/analytica_59_60-67.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**. Espanha, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014. Disponível em: <<https://jidc.org/index.php/journal/article/view/25116660/1120>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

ENGROFF, P. et al. **Parasitologia Clínica**. 1. ed. Porto Alegre: SAGAH, 2021. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9786556901572>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

FARIA, A. C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: LYON, S. et al. **Dermatologia Tropical**. 1. ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2016. 439-458. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9786557830352/>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

GOMES, M. S. *et al.* Uso de scanner em espectrofotometria de absorção molecular: aplicação em experimento didático enfocando a determinação de ácido ascórbico. **Química Nova**. Brasil, v. 31, n. 6. p. 1577–1581, 2008. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1370> Acesso em: 24 nov. 2021.

GOVERNO DO ESTADO DO PARANÁ. **Paraná doa antígeno para leishmaniose para outros países**. Disponível em: <<https://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=76180&tit=Parana-doa-antigeno-para-leishmaniose-para-outros-paises>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Res Vet Sci**. Brasil, v. 123, p. 261-272, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528818303631?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 nov, 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico - Doenças Tropicais Negligenciadas**. 1. ed. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/marco/3/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf> . Acesso em: 24 nov. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 56, de 30 de outubro de 2018. Torna pública a decisão de incorporar a miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar em primeira linha de tratamento no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS. **Diário Oficial da União**. Brasília, 31 de outubro de 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/47986543>. Acesso em: 24 nov. 2021.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** Canadá, v. 94, n. 3, p. 489-493, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775878/pdf/tropmed-94-489.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

PASSOS, J. P. da S. **Padronização do método de produção do antígeno para Intradermorreação de Montenegro**. 89 f. Dissertação (Pós-Graduação em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8435/2/154.pdf>> . Acesso em: 24 nov. 2021.

RODRIGUES, B. S. de S. L. et al. Leishmaniose Tegumentar. In: SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. **Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda, 2020. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/books/9788527736473>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

SILVA, A. F. **A reação intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da leishmaniose tegumentar**. 189 f. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8253/2/117.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2021.