

Killarney Ataide Soares

**VALIDAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM EXO-
ANTÍGENOS E DA IMUNOFLUORESCÊNCIA
DIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Brasília - DF
2011

Killarney Ataide Soares

**VALIDAÇÃO DO TESTE DE ELISA COM EXO-
ANTÍGENOS E DA IMUNOFLUORESCÊNCIA
DIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas

Orientadora: Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio

Brasília - DF
2011

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE

Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio – FM/UnB / Orientador

MEMBROS

Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino – FMRP/USP

Prof. Dr. Jeffrey Jon Shaw – Instituto de Biociências/USP

Profa. Dra. Maria Imaculada Muniz Barbosa Junqueira – FM/UnB

Prof. Dr. Albino Verçosa Magalhães – FM/UnB

SUPLENTE

Prof. Dr. Pedro Luiz Tauil – FM/NMT/UnB

“Este magnífico sistema do sol, planetas e cometas poderia somente proceder do
conselho e domínio de um Ser inteligente e poderoso.”

“A necessidade metafísica cega, que certamente é a mesma sempre e em todos os
lugares, não poderia produzir nenhuma variedade de coisas. Toda aquela
diversidade das coisas naturais que encontramos adaptadas a tempos e lugares não
se poderia originar de nada a não ser das idéias e vontade de um Ser
necessariamente existente.”

“E dessa forma muito do que concerne a Deus, no que diz respeito ao discurso sobre
ele a partir das aparências das coisas, certamente pertence à filosofia natural.”

Sir. Isaac Newton – em trechos de Principia

DEDICAÇÃO

Aos meus pais, Santos da Conceição Soares e Conceição Auxiliadora Ataíde Soares. Meus exemplos, meus balizadores, minhas referências, meus educadores! Por me mostrarem que a educação não é uma preparação para a vida. É a própria vida!

À Ana Cristina Guedes Soares, minha amada e inestimável esposa. A você eu sou eternamente grato pela compreensão, pela abnegação e por me apoiar nesta caminhada. Minha linda, esta vitória também é sua!!!

Aos meus filhos: Júlia e Carlos Eduardo, a quem peço perdão pelos momentos de ausência. Por vocês, todo meu amor!

Aos meus irmãos, Kennerly e Kadija. Por me ensinarem a partilhar, a compreender e aprender a amar aqueles a quem “não” escolhemos do nosso lado.

Às vovós Conceição e Ana. Por todo exemplo de vida como mães que formaram grandes famílias, em todos os sentidos! Amo vocês!

À farmacêutica e doutora Maria Helena de Araújo Guedes, Sr. Geraldo Bernardino Guedes, Anália Helena e Carlos Jacques, Manoel Eduardo e Silvia Dantas e Verônica e Erik Lins. A vocês que fazem parte da minha família e que tantos nos apoiaram desde que chegamos à Brasília. Também dedico à minha nova cunhada Niely Codolette. Muito obrigado a todos vocês!

AGRADECIMENTOS

É difícil e, por vezes, injusto materializar em letras e palavras todo um caminho que não se iniciou no ano de 2007, mas bem antes, quando as primeiras letras riscavam um caderno brochura, sem pautas, num jardim de infância no interior de Minas Gerais... Mas, tentemos!

A Deus, senhor de todas as coisas, criador do “Céu e da Terra”, beleza e amor intangíveis e inimagináveis à nós;

À professora doutora Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio, pelo saber transmitido, pela carinhosa amizade, pela confiança depositada e pelo exemplo que tem sido à minha pessoa.

À farmacêutica e doutora Gilcilene Maria dos Santos. Por me introduzir na Universidade de Brasília, pela amizade que parece vir de “outras datas” e pelo exemplo de garra em quem me espelho.

Às colegas de pós-graduação, que se tornaram grandes amigas: Ada Amália Ayalla Urdapilleta e Jacksandra Campos, pelo companheirismo, cumplicidade e senso crítico. Compartilho com vocês esta vitória!

Aos técnicos do Laboratório de Dermatocologia: Tércio Rodrigues e Viviane Medeiros que muito contribuíram em diversas etapas deste trabalho com sua destreza e conhecimento técnico, além das horas de agradável convivência.

À professora doutora Maria Terezinha Bahia e ao professor doutor Washington Luis Tafuri, ambos da Universidade Federal de Ouro Preto, dos quais tive a honra de ser aluno e por meios deles fui introduzido na pesquisa básica em Parasitologia, ainda como aluno PIBIC. Vocês são e serão meus exemplos!

Ao professor doutor Pedro Tauil, por transbordar conhecimento, por transmiti-lo de maneira tão maravilhosa e humilde, e por fazer a estatística inteligível a este doutorando.

À professora doutora Ana Maria Roselino Ferreira e à farmacêutica e técnica Flávia Almeida, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela valiosa participação na identificação das espécies das leishmanias envolvidas.

Aos professores doutores Gustavo Romero, Carmem Déa e Selma Kückelhaus por jogarem mais luz sobre este trabalho e por repartirem seus conhecimentos quando da etapa de qualificação ajudando-me à aperfeiçoá-lo.

Aos funcionários da pós-graduação em Ciências Médicas: Alessandro Gledson, Daniele Gomes e Jacqueline Almeida, pelo carinho, amizade, presteza e eficiência.

Aos colegas de pós-graduação, com quem aprendi, tive a oportunidade de trabalhar em conjunto e de repartir experiências. Lícia Mota, Juscelino Castro, Ana Helena Germoglio, Ana Carolina Santeli, Maria Aparecida Teixeira e demais. Saibam que aprendi muito com todos!

Ao Laboratório de Imunologia Celular, especialmente nas pessoas da Profa. Doutora Maria Imaculada Junqueira e das técnicas Shirley e Luciana, no uso do aparelho de ELISA e no “socorro” às demandas por alguns reagentes e vidrarias, o que contribuiu sobremaneira para a confecção de várias etapas desta tese.

Ao Laboratório Multidisciplinar em Doença de Chagas, especialmente nas pessoas do Prof. Doutor Antônio Teixeira, Ana Cássia Vexenat, a doutoranda Perla Fabíola, ao doutorando Alessandro Sousa e o mestrando Fernando Pimentel pela solicitude e disposição em colaborar nas etapas cruciais deste trabalho.

Aos verdadeiros amigos: Leonardo e Sueli Moreira. Mesmo de longe, o saber acadêmico de vocês e nossa gostosa amizade me ajudaram a chegar até aqui.

À universidade pública e gratuita.

Por fim, agradeço com sinceridade:

Aos colegas de lida na gloriosa Força Aérea Brasileira:

Brigadeiro Médico Álvaro Barde Bezerra e Brigadeiro Médico Celso Gonçalves Bencardino, ex-comandantes do Hospital de Força Aérea de Brasília, que permitiram e apoiaram-me nas fases iniciais deste projeto.

Ten. Cel. Farmacêutico Joselito dos Santos, Cap. Farmacêutica Jaína Mara do Patrocínio Azevedo, Cap. Farmacêutica Maria Amélia Ferraz e Cap. Farmacêutico Flávio Gaspar Bianchi, Tenentes Farmacêuticos Henrique Cilento, Galgany, Fernanda, Renata, Ariane, Juliana e Rayza. Sargentos Santana, Albert, Danielle Viana, Daniele Lopes, Lucélia, Alba, Borgatte, Larissa, Roger e Cabo Marclei (*in memorian*). À todos vocês do laboratório de Análises Clínicas do HFAB, agradeço pelo apoio e amizade nestes árduos 4 anos. Valeu gente!!!

Aos colegas de lida na Coordenação de Saúde da Presidência da República na pessoa da Dra. Fernanda Letícia Mendes Alves de Aguiar, Coordenadora de Saúde da Presidência da República e colegas do Laboratório: Dener Alves de Oliveira, Vicente Moraes, saudosa Zélia Maria Cavaggioni, Cláudia Souza e Aldair Lisboa. A vocês meu obrigado pelo apoio na forma de compreensão, pela amizade e pela gostosa convivência nestes últimos 8 meses desde que cheguei à COSAU.

Às médicas Dra. Jorgeth Motta e Dra. Cláudia Porto, à cada um dos residentes em Dermatologia, Patrícia, Pedro, Fernanda, Adriana e Daniela e aos funcionários do Ambulatório de Dermatologia do HUB, Nadja, Francineide, Erik e Marcos. A vocês sou profundamente grato por tornarem possível a conclusão deste projeto ao me auxiliarem no acompanhamento dos pacientes, na exaustiva coleta das amostras e na pesquisa de prontuários. Muito obrigado!

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é um problema de saúde pública, cujo diagnóstico depende dos diversos métodos empregados em conjunto, na busca de obter melhor sensibilidade e especificidade. O objetivo do presente estudo foi validar a técnica de ELISA empregando exoantígenos (ELISA exoAg) de *Leishmania mexicana* e a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) para o diagnóstico da LTA em amostras de pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília. O projeto incluiu 106 pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana atendidos entre os anos de 2007 e 2010, cuja confirmação da infecção ocorreu por critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Foi realizada a coleta de amostra sanguínea e de fragmento de lesão de tecido cutâneo na fase pré-tratamento. Os soros foram armazenados a -20°C e o fragmento de lesão foi comprimido sobre uma lâmina de vidro em 6 pontos e a lâmina foi fixada com acetona em banho de gelo. O teste de ELISA com Exo-Ag foi realizado com soros pré-diluídos proporção 1:100. Os resultados demonstraram que houve predomínio da forma cutânea (84,9%) e apenas 15,1% de casos na forma mucosa. Os casos de infecção pela primeira vez somaram maioria (83%) contra 11% de recidivas. O ELISA exo-Ag demonstrou sensibilidade de $90,8 \pm 5,7\%$ ($n = 98$; IC 95%). Em grupo controle composto por pacientes aparentemente saudáveis a especificidade do ELISA exo-Ag foi de $91,3 \pm 6,2\%$ ($n = 80$; IC 95%). Quanto à especificidade, em amostras de pacientes portadores de diversas doenças: doença de Chagas: $66,7 \pm 18,8\%$ ($n = 24$; IC 95%); em amostras de portadores de doenças reumáticas: $42,4\% \pm 16,9\%$ ($n = 33$; IC 95%); pênfigo foliáceo: $76,9 \pm 22,9\%$ ($n = 13$; IC 95%); hanseníase virchowiana: $85,7 \pm 24,2\%$ ($n = 8$; IC 95%); soros com reação VDRL positivas: $87,5 \pm 15,7\%$ ($n = 16$; IC 95%); e micoses profundas: $77,8 \pm 27,4\%$ ($n = 9$; IC 95%). O ELISA exo-Ag obteve valor preditivo positivo de $73,5 \pm 8,8\%$ ($n = 96$), negativo de $93,3 \pm 5,4\%$ ($n = 81$) e acurácia de 87,6%. A IFD, por sua vez, apresentou sensibilidade de $72,2 \pm 10,4\%$ ($n = 72$; IC 95%) e em amostras de pacientes com lesão cutânea, mas não portadores de LTA, a especificidade foi de $96,3 \pm 5,0\%$ ($n = 55$; IC 95%), garantindo valor preditivo positivo de $96,3 \pm 4,3\%$ ($n=79$), negativo de $72,6 \pm 10,1\%$ ($n=75$) e acurácia de 82,7%. A PCR-RFLP verificou presença de subgênero *Viannia* na maior parte das amostras indicando tratar-se da espécie *L. V. braziliensis*. A avaliação dos custos verificou que os dois métodos propostos custam 40 % mais que o conjunto de técnicas de rotina, por paciente. Por outro lado, a análise dos resultados dos testes propostos, de forma concomitante, demonstrou aumento na sensibilidade e na especificidade, com a vantagem da rapidez do resultado. Os resultados demonstraram bom desempenho do ELISA exo-Ag e da IFD, e validaram as 2 técnicas propostas para o diagnóstico de LTA causada por *L. braziliensis*.

ABSTRACT

American Cutaneous leishmaniasis (ACL) is a public health problem whose diagnosis depends on the various methods used together in the quest to get better sensitivity and specificity. The purpose of this study was to validate the ELISA technique employing exoantigens (ELISA exoAg) of *Leishmania mexicana* and direct immunofluorescence (DIF) for the diagnosis of ACL. in samples from patients at the Clinic of Dermatology, University Hospital of Brasília. The project included 106 patients with cutaneous leishmaniasis treated between the years 2007 and 2010, whose infection was confirmed by clinical, epidemiological and laboratory. We collected blood sample and a fragment of skin tissue injury in the pre-treatment. Sera were stored at -20° C and fragment of lesion was compressed on a glass slide in six points. The blade was fixed with acetone in ice bath. The ELISA with Exo-Ag was carried out with sera pre-diluted 1:100 ratio. The results showed a predominance of cutaneous form (84.9%) and only 15.1% of cases in the mucosal form. The new cases totaled majority (83%) against 11% of recurrences. The exo-Ag ELISA showed sensitivity of $90.8 \pm 6.2\%$ (n = 98, CI 95%). In control group of apparently healthy patients, the specificity of exo-Ag-ELISA was $91.3 \pm 5.7\%$ (n = 80; CI 95%). For specificity, we tested sera from patients with various diseases: patients with rheumatic diseases: $42.4 \pm 16.9\%$ (n = 33; CI 95%); Chagas' disease: $66.7 \pm 18.8\%$ (n = 24, CI 95%); pemphigus foliaceus: $76.9 \pm 22.9\%$ (n = 13, CI 95%), hanseniasis: $85.7 \pm 24.2\%$ (n = 8, CI 95%); patients with VDRL positive test: $87.5 \pm 15.7\%$ (n = 16, CI 95%) and deep mycoses: $77.8 \pm 27.4\%$ (n = 9, CI 95%). The exo-Ag ELISA obtained positive predictive value of $73.5 \pm 8.8\%$ (n = 96; CI 95%), negative predictive value of $93.3 \pm 5.4\%$ (n = 81; CI 95%) and 87.6% of accuracy. The DIF, showed sensitivity of $72.2 \pm 10.4\%$ (n = 72, CI 95%) and specificity was $96.3 \pm 5.0\%$ (n = 55, CI 95%) in samples from patients with skin lesions (but not patients with ACL), ensuring positive predictive value of $96.3 \pm 4.3\%$ (n = 79; CI 95%), negative predictive value of 72.6 ± 10.1 (n = 75; CI 95%) and accuracy of 82.7%. The PCR-RFLP found *Viannia* subgenus of most of the samples, that indicated the presence of the species *L. V. braziliensis*. The evaluation found that the two proposed methods cost 40% more than the set of routine, per patient. However, the analysis of the results of the proposed tests, concomitantly, showed an increase in sensitivity and specificity, with the advantage of less time to finish. The results showed good performance of the exo-Ag ELISA and DIF, and validated the two proposed techniques for the diagnosis of ACL caused by *L. braziliensis*.

SUMÁRIO

I INTRODUÇÃO	01
1.1 Situação atual do diagnóstico da LTA.....	03
1.2 Validação de testes diagnósticos.....	07
1.3 Métodos propostos.....	08
1.3.1 Imunofluorescência direta (IFD)	08
1.3.2 ELISA (<i>Enzyme linked immunossorbent assay</i>).....	09
1.3.2.1 ELISA com exoantígenos produzidos em meio livre de proteínas	
.....	10
II OBJETIVOS.....	15
2.1 Geral	16
2.2 Específicos.....	16
III MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Tipo de estudo.....	18
3.2 População estudada.....	18
3.3 Tamanho da amostra populacional	18
3.4 Critérios de inclusão	19
3.5 Critérios de exclusão.....	19
3.6 Obtenção das amostras	19
3.7 Exames de rotina para o diagnóstico da LTA.....	20
3.7.1 Intradermorreação de Montenegro	20
3.7.2 Exame Histopatológico	20
3.7.3 Pesquisa Direta de Formas Amastigotas em Lâmina	20
3.7.4 Cultura do Aspirado de Lesão	21
3.7.5 Reação de Imunofluorescência Indireta	21
3.8 Testes propostos (ELISA exo-Ag e IFD) e PCR-RFLP em amostras de	
pacientes com LTA confirmada.....	22
3.8.1 Reação de ELISA com exo-antígenos (ELISA exo-Ag)	22
3.8.1.1 Princípio do teste	22
3.8.1.2 Metodologia do teste.....	22
3.8.2 Imunofluorescência Direta (IFD)	23
3.8.2.1 Princípio do teste	23

3.8.2.2 Metodologia do teste.....	23
3.8.3 Conflito de interesses	25
3.8.4 Reação da polimerase em cadeia e Análise do polimorfismo de fragmentos de DNA (PCR-RFLP)	26
3.8.4.1 Princípio do teste	26
3.8.4.2 Metodologia do teste.....	26
3.9 Amostras para determinação da especificidade	28
3.9.1 Amostras de pacientes aparentemente saudios e sem LTA.....	28
3.9.2 Amostras de pacientes portadores de outras doenças.....	28
3.10 Análise estatística	29
3.11 Mensuração do custo de cada técnica e avaliação do custo-benefício.....	31
IV – RESULTADOS	32
4.1 Dados gerais dos pacientes incluídos.....	33
4.2 Dados epidemiológicos dos 106 pacientes portadores de LTA	33
4.3 Dados clínicos dos 106 pacientes portadores de LTA	38
4.4 Exames de rotina para o diagnóstico da LTA	40
4.5 Sorologia para Doença de Chagas em amostras de 102 pacientes portadores de LTA	40
4.6 ELISA exo-Ag em amostras de 98 pacientes portadores de LTA.....	41
4.7 Especificidades e acurácia do teste de ELISA exo-Ag.....	41
4.7.1 ELISA exo-Ag em amostras de 80 indivíduos aparentemente saudios e não portadores de LTA.....	41
4.7.2 ELISA exo-Ag em amostras de 24 pacientes portadores de doenças de Chagas.....	42
4.7.3 ELISA exo-Ag em amostras de 33 pacientes portadores de doenças reumáticas	42
4.7.4 ELISA exo-Ag em amostras de 13 pacientes portadores de pênfigo foliáceo sulamericano.....	42
4.7.5 ELISA exo-Ag em amostras de 8 pacientes portadores de hanseníase virchowiana.....	43
4.7.6 ELISA exo-Ag em amostras de 16 pacientes com reação VDRL positiva.....	43
4.7.7 ELISA exo-Ag em amostras de 9 pacientes portadores de micoses profundas.....	44

4.7.8 Especificidade do teste de ELISA exo-Ag em grupo controle composto por indivíduos com outras doenças mais aqueles aparentemente sadios	45
4.7.9 Acurácia do teste de ELISA exo-Ag.....	46
4.8 IFD em lâminas com <i>imprints</i> de fragmento de lesão cutânea provenientes de 72 pacientes portadores de LTA.....	46
4.9 Especificidade e valores preditivos do teste da IFD.....	46
4.10 Acurácia do teste de IFD.....	47
4.11 Sensibilidade conjunta dos métodos propostos.....	47
4.12 PCR-RFLP a partir de papel de filtro com <i>imprints</i> de fragmento de lesão cutânea proveniente de 64 pacientes portadores de LTA.....	46
4.13 Análise do resultado da PCR-RFLP em função das formas clínicas da LTA.....	54
4.14 Análise dos resultados dos testes propostos em relação à parâmetros clínicos e laboratoriais.....	55
4.15 Mensuração dos custos de cada técnica de diagnóstico.....	56
V DISCUSSÃO.....	58
VI CONCLUSÕES.....	78
VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
VIII ANEXOS.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS

% - porcentagem
μg - micrograma
μL – microlitro
μm - micrômetro
μM - micromolar
°C - grau centígrado
A – acurácia
AMB – Associação Médica Brasileira
ASO – antiestreptolisina O
CDC – *Center Of Disease Control*
cm – centímetro
CN – controle negativo
CP – controle positivo
CCS – coração-cérebro-sangue
DATASUS – Banco de dados do Sistema Único de Saúde
DF – Distrito Federal
DNA – ácido desoxirribonucléico
dNTP – desoxirribonucleotídeo 5' – trifosfato
dUTP - desoxiuridina 5' – trifosfato
E - especificidade
EMFA – Estado-maior das Forças Armadas
ELISA – *Enzyme linked immunossorbent assay*
exo-Ag – exo-antígenos
FR – fator reumatóide
g - grama
GIPL - glicoinositolfosfolipídeos
gp – glicoproteína
HAE – Haemophilus aegyptius
HFAB – Hospital de Força Aérea de Brasília
Histopat. – exame histopatológico
HSP – *heat shock protein*
HUB – Hospital Universitário de Brasília
IFD – Imunofluorescência direta

IRM – Intradermorreação de montenegro
kDa – kilodalton
LA – *Leishmania amazonensis*
LB – *Leishmania braziliensis*
LCD – Leishmaniose cutâneo difusa
LCM – Leishmaniose cutâneo mucosa
LD – *Leishmania donovani*
LIT – *liver infusion triptose*
LTA – leishmaniose tegumentar americana
LV – leishmaniose visceral
M – marcador de peso molecular
ml – mililitros
mm – milímetro
NI – não informado
NNN – McNeal, Novy & Nicolle
NR – não realizado
P - prevalência
PAGE – *polyacrylamid gel eletrophoresis*
pb – pares de bases
PBS – *phosphate buffer solution*
PCR – *polimerase chain reaction*
PCR – proteína C reativa
PNE – prontuário não encontrado
q.s.p. – quantidade suficiente para
RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RIFI – reação de imunofluorescência indireta
SDS – dodecil sulfato de sódio
S - sensibilidade
SEPLAN –Secretaria de Planejamento
SINAN – Sistema Nacional de Agravos de Notificação
Taq – *Thermus aquaticus*
TMB – tetrametilbenzidina
USP – Universidade de São Paulo
VDRL – *Veneral Disease Research in Laboratory*
WHO – *World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Visualização de formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> após reação de imunofluorescência direta positiva em lâmina impregnada com tecido cutâneo de lesão, obtido por biópsia em paciente com leishmaniose cutânea.....	8
FIGURA 2: Eletroforese em gel de SDS-PAGE. Exo-antígenos de formas promastigotas de <i>L. donovani</i> separados por eletroforese em gel de gradiente 4-12% e visualização com Comassie coloidal G-250	12
FIGURA 3: Reação de <i>western blot</i> demonstrando sororreatividade entre amostras de 10 pacientes portadores de leishmaniose cutânea (C1 a C10) e os exo-antígenos de <i>L. mexicana</i> versus soros controle (pacientes sadios, de N1 a N4) que não apresentaram reação frente aos mesmos antígenos	14
FIGURA 4: Técnica de imunofluorescência direta para pesquisa de leishmânia em lâmina em 4 momentos.	25
FIGURA 5: Resultado quanto ao sexo dos 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	32
FIGURA 6: Distribuição, por região administrativa de provável contágio, de 16 pacientes portadores de LTA, procedentes do DF, atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	37
FIGURA 7: Distribuição, por cidade de provável contágio, de 30 pacientes portadores de LTA, procedentes do Entorno do DF e atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	37
FIGURA 8: Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de <i>Leishmania sp</i> a partir de extraído de papel de filtro impregnado com fragmento de tecido de lesão cutânea de 10 pacientes portadores de LTA.....	48
FIGURA 9: Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de <i>Leishmania sp</i> a partir de extraído de papel de filtro impregnado com fragmento de tecido de lesão cutânea de 27 pacientes portadores de LTA.....	49
FIGURA 10: Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de <i>Leishmania sp</i> a partir de extraído de papel de filtro impregnado com fragmento de tecido de lesão cutânea de 27 pacientes portadores de LTA.....	49
FIGURA 11: Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de <i>Leishmania sp</i> a partir de extraído (em volume de 7 µL) de papel de filtro impregnado com fragmento de tecido de lesão cutânea de pacientes portadores de LTA.....	50

FIGURA 12 Gel de poliacrilamida a 10% com produtos de PCR após digestão pela enzima <i>HAE</i> III proveniente de 16 portadores de LTA.....	51
FIGURA 13: Gel de poliacrilamida a 10% com produtos de PCR após digestão pela enzima <i>HAE</i> III proveniente de 22 portadores de LTA.....	52
FIGURA 14: Gel de poliacrilamida a 10% com produtos de PCR após digestão pela enzima <i>HAE</i> III proveniente de 12 portadores de LTA.....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Matriz para cálculo dos indicadores para as reações de ELISA com exo-antígenos e de Imunofluorescência Direta em portadores de LTA	29
TABELA 2: Resultado quanto à faixa etária dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	34
TABELA 3: Resultado quanto à ocupação dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	35
TABELA 4: Resultado quanto à procedência dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	35
TABELA 5: Resultado quanto ao local de provável contágio, conforme relato dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	36
TABELA 6: Resultado quanto à forma clínica da LTA em 106 pacientes atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	38
TABELA 7: Resultado quanto ao relato da ocorrência da lesão cutânea, se pela primeira vez ou se recidiva, em 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	38
TABELA 8: Resultado quanto ao número de lesões por paciente, em 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	38
TABELA 9: Resultado quanto à localização das lesões, por paciente, em 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	39
TABELA 10: Resultado quanto ao tempo da(s) lesão(ões) em 106 pacientes portadores de LTA atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	39
TABELA 11: Resultado quanto ao tipo da lesão em 106 pacientes portadores de LTA atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010	39
TABELA 12: Resultados das sensibilidades dos testes para diagnóstico em amostras de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Hospital Universitário de Brasília, no período de agosto de 2007 a julho de 2010	40
TABELA 13: Resultado da sorologia para doença de Chagas de 102 pacientes com diagnóstico de LTA e com potencial para realização do teste de ELISA exo-Ag, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010	40

TABELA 14: Resultado do ELISA utilizando exo-antígenos de <i>L. mexicana</i> em soros de 98 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	41
TABELA 15: Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 80 pacientes aparentemente saudáveis e não portadores de LTA.....	41
TABELA 16: Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em amostras de 24 pacientes portadores de doença de Chagas, confirmada por critérios clínicos e por RIFI e PCR.....	42
TABELA 17: Resultados do teste de ELISA utilizando exo-Ag em amostras de 33 pacientes portadores de doenças reumáticas	42
TABELA 18: Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em amostras de pacientes portadores de pêfnigo foliáceo sulamericano confirmado por critérios clínicos e por exame histopatológico.....	43
TABELA 19: Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 8 pacientes portadores de hanseníase virchowiana confirmada por critérios clínicos e pela baciloscopia e exame histopatológico	43
TABELA 20: Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 16 pacientes com reação VDRL positiva.....	44
TABELA 21: Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 16 pacientes portadores de micoses profundas confirmadas por critérios clínicos, exame histopatológico e laboratoriais	44
TABELA 22: Especificidade do teste de ELISA com exo-Ag em grupo controle composto por 78 pacientes portadores de outras patologias mais 80 pacientes aparentemente saudáveis e não portadores de LTA.....	45
TABELA 23: Resultado da IFD em <i>imprints</i> de fragmentos de lesão cutânea em lâmina, provenientes de 72 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	46
TABELA 24: Resultado do teste de IFD em lâminas com <i>imprint</i> de fragmento de lesão cutânea de 55 pacientes não portadores de LTA de acordo com critérios clínicos, epidemiológicos e/ou laboratoriais.....	47
TABELA 25: Número de testes de ELISA exo-Ag e de IFD positivos e negativos em 64 portadores de LTA, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010	47

TABELA 26: Resultados da caracterização dos subgêneros de <i>Leishmania sp</i> por meio da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima <i>HAE III</i> em amostras de papel de filtro com <i>imprint</i> de lesão cutânea de 47 pacientes portadores de LTA atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB, entre agosto de 2007 e julho de 2010	54
TABELA 27: Resultado da PCR-RFLP frente às formas clínicas da LTA em 47 pacientes portadores atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	54
TABELA 28: Resultados dos testes de ELISA exo-Ag e da IFD em relação à parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes portadores de LTA atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	55
TABELA 29: Resultados dos testes de ELISA exo-Ag e da IFD em relação aos testes de laboratoriais de rotina de pacientes portadores de LTA atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010.....	56
TABELA 30: Custo aproximado por teste, em reais, de cada técnica utilizada para o diagnóstico da LTA e da Imunofluorescência Direta.....	57

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Resultado da reação imunoenzimática empregando exoantígenos de <i>L. mexicana</i> em soros de pacientes portadores de doenças diversas ou com reação de VDRL positiva	45
--	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Testes parasitológicos para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana e suas vantagens, limitações e sensibilidades de acordo com a literatura pesquisada	4
QUADRO 2: Testes imunológicos para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana, suas vantagens, limitações e sensibilidades de acordo com a literatura pesquisada	5
QUADRO 3: Exames histopatológico e moleculares para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana e suas vantagens, limitações e sensibilidades de acordo com a literatura pesquisada.....	6

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou leishmaniose cutânea do Novo Mundo é uma doença infecto-parasitária causada por parasitos do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) que produzem diferentes manifestações clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, da relação do parasito com o seu hospedeiro e da resposta imune deste.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são flagelados e pertencem ao Filo *Protozoa*, Ordem *Kinetoplastida* (Doflein, 1901; Woodcock, 1906). São classificados como da Família *Trypanosomatidae* (Honigberg, 1963; Vickerman, 1976) em função de possuírem hospedeiros vertebrados e invertebrados. Diferenciam-se, no entanto, do gênero *Trypanosoma* pelo fato de se apresentarem sob as formas amastigota, promastigota e paramastigota (Subgênero *Viannia*).

Dados recentes mostram que a leishmaniose afeta aproximadamente 12 milhões de pessoas em 88 países (leishmaniose do Velho e do Novo Mundo), sendo que 350 milhões vivem em risco de contaminação e estima-se que haja 1,5 milhões de novos casos todos os anos (ALVAR, 2006; GONZÁLEZ *et al.*, 2009; WHO, 2009). No Brasil, o número de casos novos reportados entre 2005 e 2009 ultrapassou os 25.000 casos (WHO, 2009).

As formas clínicas da LTA podem ser cutânea e cutâneo-mucosa. A forma cutâneo-mucosa, considerada de maior gravidade, é assim caracterizada por atingir as mucosas, não apenas a nasal, mas a da faringe e laringe, provocando lesões destrutivas e conseqüentes desfigurações e transtornos emocionais aos pacientes (MAGALHÃES *et al.* 1990; GRIMALDI JR E TESH, 1993; RODRIGUES *et al.*, 2006; REITHINGER *et al.*, 2007).

O diagnóstico realizado para a leishmaniose baseia-se nas manifestações clínicas apresentadas pelo paciente, em dados epidemiológicos e nos resultados de técnicas laboratoriais diversas que tentam complementar-se a fim de obter maior sensibilidade.

A importância do diagnóstico laboratorial é evidenciada por MENEZES DA SILVA *et al.*, 2007, que verificaram que dos 30.695 casos de LTA notificados naquele ano, 25.332 (83%) foram confirmados por critério laboratorial, enquanto que em 4.322 (14%) utilizaram-se critérios clínico-epidemiológicos. Pesquisa no banco de dados do

Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), do Ministério da Saúde, mostra que o critério laboratorial foi determinante para o diagnóstico em 77,6 % dos casos de LTA em série histórica nos anos de 2001 a 2005 (DATASUS, 2009).

Há aquelas de cunho parasitológico, cujo diagnóstico baseia-se na pesquisa do parasito tais quais a pesquisa direta de forma amastigota em lâmina corada, o exame histopatológico e o cultivo do parasito em meio de cultura (“in vitro”) ou em animais de biotério (“in vivo”). Há também técnicas imunológicas como as reações sorológicas para detecção de anticorpos, como a imunofluorescência indireta (RIFI) e o ELISA (*Enzyme linked immunossorbent assay*) com suas variações quanto aos antígenos utilizados. Outra técnica imunológica é a Intradermoreção de Montenegro (IRM), que avalia a hipersensibilidade retardada do paciente frente ao antígeno de *Leishmania*.

Este trabalho propõe-se a validar 2 métodos de diagnóstico para a LTA: o ELISA que utiliza exo-antígenos (Exo-Ag) de formas promastigotas de *L. mexicana* e a Imunofluorescência Direta (IFD) empregando anticorpos policlonais anti-*Leishmania*, levando também em consideração o custo, por teste, de cada kit avaliado.

1.1 Situação atual do diagnóstico da LTA

O diagnóstico da LTA inclui manifestações clínicas, dados epidemiológicos e resultados de testes laboratoriais. As técnicas utilizadas em laboratório são diversas, na tentativa visível de se complementarem em função das limitações inerentes à cada uma. Os métodos diagnósticos considerados como padrão ouro ainda são a demonstração do parasito em amostras de tecido corado e a cultura *in vitro* do parasito em meios específicos (WEIGLE et al., 2002).

Os Quadros 1, 2 e 3 elencam os métodos (parasitológicos, imunológicos, histológico e moleculares) usados para o diagnóstico da LTA com suas vantagens e desvantagens, além das respectivas sensibilidades obtidas por diversos grupos de pesquisadores.

Diante do observado na literatura no que tange, sobretudo, às limitações de cada técnica, o diagnóstico da LTA ainda carece de opções que agreguem boas qualidades, como sensibilidade e especificidades elevadas, ao menor custo, aliado à rapidez e o conforto para o paciente.

Quadro 1 – Testes parasitológicos para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana e suas vantagens, limitações e sensibilidade de acordo com a literatura pesquisada

TIPO	TESTE	VANTAGENS	LIMITAÇÕES	SENSIBILIDADE
Parasitológicos	Pesquisa direta em lâmina	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnóstico de certeza; - Baixo custo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilidade de automação; - Procedimento invasivo para obtenção de amostra; - Subjetividade na interpretação; - Necessidade de laboratoristas experientes tanto na orientação quanto à coleta, quanto na confecção da lâmina; - Infecções por <i>L. V. braziliensis</i> por seu diminuto tamanho e escassez em lesões com mais de 3 meses. 	De 14 a 89,7% (CUBA et al., 1980; CUBA et al., 1981; NAVIN, 1990; WEIGLE, 1993; RODRIGUES et al.; 2002; SAMPAIO et al.; 2002; PERLES et al., 2006; MENEZES DA SILVA et al., 2007; REIS et al., 2008; LUZ et al., 2009; MURBACK et al., 2011).
	Cultura “in vitro” (fase sólida NNN ou meio líquido Schnider, LIT ou CCS)	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnóstico de certeza; - Isola o parasito para estudos futuros; - Baixo custo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilidade de automação; - Necessidade de técnico experiente; - Possibilidade de contaminação; - A espécie <i>L. V. braziliensis</i> tem crescimento lento; - Emissão do resultado ate 1 mês. 	De 28,6 a 89% (SALINAS et al., 1989; MARZOCHI et al., 1993; ROMERO et al., 1999; WEIGLE et al., 2002; SAMPAIO et al., 2002; RODRIGUES et al.; 2002, CHOUHI et al., 2009; LUZ et al., 2009; SZARGIKI et al., 2009; MURBACK et al., 2011)
	Inoculação em hamster	<ul style="list-style-type: none"> - Diagnóstico de certeza; - Sensibilidade mais alta que pesquisa de amastigotas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Impossibilidade de automação; - Metodologia complexa; - Procedimento invasivo para obtenção de amostra; - Elevado custo (sangue de animal); - Risco de acidentes por inoculação acidental; - Requer técnico experiente; - A sensibilidade depende do número de tubos; - Emissão do resultado ate 1 mês; 	56,7 e 75% empregando inóculo de tecido biopsiado (NAVIN, 1990; MURBACK et al., 2011) e 41,3% utilizando inóculo de aspirado de lesão (WEIGLE, 1993)

NNN: McNeal-Novy modificado por Nicolle; LIT: *Liver Infusion Triptose* (triptose infuso de fígado); CCS: coração-cérebro-sangue.

Quadro 2 – Testes imunológicos para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana, suas vantagens, limitações e sensibilidade de acordo com a literatura pesquisada

TIPO	TESTE	VANTAGENS	LIMITAÇÕES	SENSIBILIDADE
Imunológicos	Intradermoreação de Montenegro	- Elevada sensibilidade; - Baixo custo; - Método pouco invasivo.	- Teste “positivo” na infecção inaparente, recidiva; reações cruzadas: doença de Chagas, micoses profundas (esporotricose e cromomicose), tuberculose e hanseníase (forma virchowiana) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007); - Impossibilidade de automação; - Diferentes antígenos utilizados nos testes.	De 30 a 100% (FERREIRA <i>et al.</i> , 2006; PERLES <i>et al.</i> , 2006; MENEZES DA SILVA <i>et al.</i> , 2007; REIS <i>et al.</i> , 2008; LUZ <i>et al.</i> , 2009).
	Imunofluorescência Indireta	- Elevada sensibilidade; - Coleta pouco invasiva; - Adequado para estudos epidemiológicos.	- Impossibilidade de automação; - Estrutura mínima para análise; - Reação cruzada: doenças de Chagas, paracoccidioidomicose, pênfigo-foliáceo, micoses profundas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007); - Falso-negativo: forma cutânea inicial.	89% (WALTON <i>et al.</i> , 1972), que utilizou fomas amastigotas como antígeno. De 34 a 95,4% para promastigotas como antígenos (RODRIGUES <i>et al.</i> ; 2002; GARCIA <i>et al.</i> , 2005; ROMERO <i>et al.</i> , 2005; FERREIRA <i>et al.</i> , 2006; PERLES <i>et al.</i> , 2006; REIS <i>et al.</i> ; 2008; BARROSO-FREITAS <i>et al.</i> , 2009; SZARGIKI <i>et al.</i> , 2009).
	ELISA	- Elevada sensibilidade; - Coleta pouco invasiva; - Adequado para estudos epidemiológicos.	- Estrutura mínima para análise; - Reatividade cruzada: com doenças de Chagas, paracoccidioidomicose, pênfigo-foliáceo e micoses profundas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).	De 85 a 100% para antígenos brutos (PEDRAS <i>et al.</i> , 2003, FERREIRA <i>et al.</i> , 2006; YONEYAMA <i>et al.</i> , 2007 e 60 a 100% para frações antigênicas (MARCUSI <i>et al.</i> , 2006; GOMES-SILVA <i>et al.</i> , 2008; BARROSO-FREITAS <i>et al.</i> , 2009; SZARGIKI <i>et al.</i> , 2009; CATALDO <i>et al.</i> , 2010).
	Immunoblot	- Elevada sensibilidade; - Especificidade mais elevada que outros métodos sorológicos	- Impossibilidade de automação; - Estrutura mínima para análise; - Custo elevado.	SZARGIKI, 2005; SZARGIKI <i>et al.</i> , 2009.

Quadro 3 – Exames histopatológico e moleculares para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana e suas vantagens, limitações e sensibilidade de acordo com a literatura pesquisada

TIPO	TESTE	VANTAGENS	LIMITAÇÕES	SENSIBILIDADE
Exame Histopatológico	Fragmento de biopsia corado	- Alta especificidade	- Impossibilidade de automação; - Baixa sensibilidade, sobretudo em infecções antigas; - Procedimento invasivo por biopsia; - Necessidade de médico patologista para laudo; - Demora na emissão do resultado.	De 22 a 61,9% (MEHREGAN, 1999; LANUS et al., 2005; MENEZES et al., 2007; CARNEIRO, 2009).
Molecular	PCR (hibridização, RFLP, isoenzimas e “Real time”)	- Alta sensibilidade; - Alta especificidade; - Possibilidade de identificação da espécie; - Parte do processo é automatizado; - Rapidez no diagnóstico,	- Estrutura mínima para análise, limitada à pesquisa; - Alto custo com equipamentos e reagentes.	De 51 a 100% BELLI et al., 1998 AVILES et al., 1999; RODRIGUES, 2000; RODRIGUES et al.; 2002; ANDRADE et al., 2005; BARBOSA GARCIA et al., 2005; GARCIA et al., 2005; LANUS et al., 2005; TEIXEIRA-NETO et al., 2006; REIS et al; 2008; LUZ et al., 2009; BERZUNZA-CRUZ et al., 2009; ROMERO et al., 2009).

1.2 Validação de testes diagnósticos

O processo de avaliação do desempenho de um teste laboratorial depende diretamente de critérios diagnósticos pré-estabelecidos, tais como o conhecimento prévio da presença ou ausência da doença. Esta indicação da “verdade” é denominada de “padrão-ouro” (RODRIGUES, 2000).

Os marcadores biológicos, não importando aqui se são anticorpos ou pequenas frações protéicas, podem ser validados no que se refere a eventos como doença, exposição a agentes danosos ou susceptibilidade à doenças (SCHULTE & PEREIRA, 1993). De uma maneira geral, a validação de marcadores biológicos e, mais particular, de marcadores diagnósticos de infecção, é realizada em amostragens relativamente pequenas, em que os grupos em estudo são categorizados com relação ao evento de interesse. Dessa forma, as características do marcador são determinadas, permitindo a sua utilização em estudos de grandes populações.

Um marcador de evento (doença) é válido quanto maior for a sua capacidade de indicar a presença do evento de interesse. Para validar a utilização de uma medida biológica, como um marcador, é necessário entender o relacionamento entre este e o evento ou condição que se deseja pesquisar. É então que a validação torna-se possível, por meio da medida daquilo que o teste consegue detectar. Aqui se encaixam os conceitos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos (FEINSTEIN, 1977).

A validade de um teste diagnóstico é medida pela sua habilidade em determinar com precisão as pessoas realmente doentes como positivas e as sadias como negativas para o teste (HENNEKENS & BURING, 1987).

A sensibilidade de um teste diagnóstico é definida pela capacidade de detectar indivíduos verdadeiramente doentes, enquanto que, a especificidade é a capacidade de estabelecer como negativo os indivíduos não doentes. Outros indicadores são também importantes e abordam aspectos diferentes da validade de um teste diagnóstico. O valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo expressam a probabilidade da doença estar presente ou ausente dado o resultado positivo ou negativo do teste.

Os ensaios para validação de testes diagnósticos são, portanto, etapas importantes para consolidação de procedimentos de saúde pública, na medida em que somente a partir daí é possível aplicar técnicas diagnósticas adequadas para estudos

populacionais visando o “rastreamento” de indivíduos portadores de doenças em sua fase pré-clínica e outros propósitos diagnósticos.

1.3 Métodos propostos

1.3.1 Imunofluorescência direta (IFD)

Este método baseia-se na capacidade de ligação dos anticorpos policlonais (produzidos em coelhos) com antígenos de leishmânia presentes em exsudato impregnado em lâmina por compressão do fragmento de tecido de lesão cutânea retirado em procedimento cirúrgico. Os anticorpos são marcados com fluoresceína, permitindo, em caso de positividade, a visualização de formas amastigotas ao microscópio de imunofluorescência, como demonstrado na Figura 1.

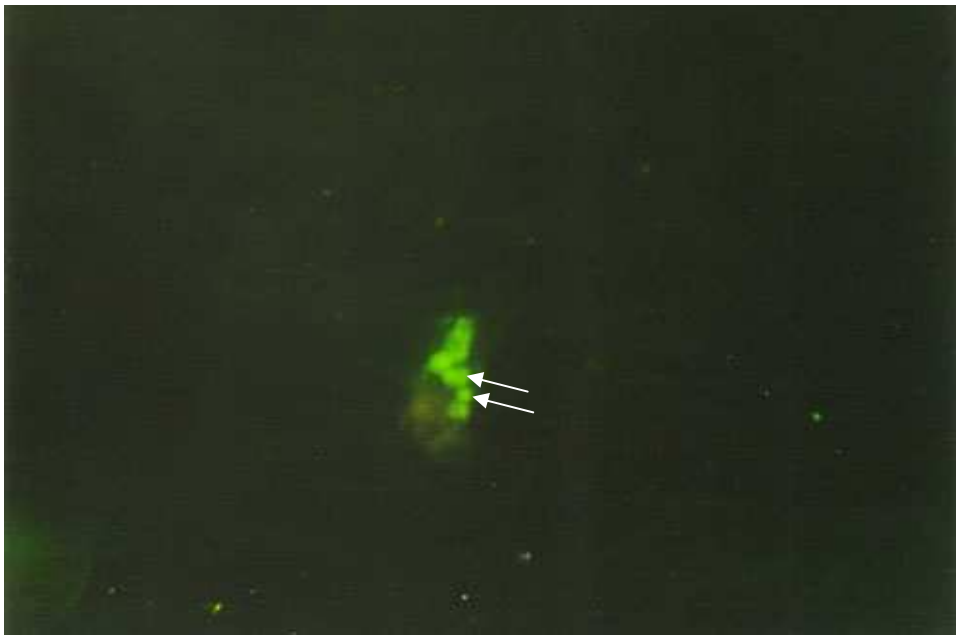


Figura 1 - Visualização de formas amastigotas de *Leishmania sp.*(setas) após reação de imunofluorescência direta positiva em lâmina impregnada com exsudato cutâneo de lesão, obtido por biópsia em paciente com leishmaniose cutânea (Fonte: acervo da empresa Cellabs, Austrália).

Esta técnica carece de estudos, o que é notado em pesquisa às base de dados científicos. Os únicos trabalhos referenciados dizem respeito a amostras obtidas a partir de linfonodos de cães, tratando-se do diagnóstico de leishmaniose visceral (LV).

Imprints de aspirados de linfonodos provenientes de cães com LV foram submetidos à IFD, utilizando anticorpo policlonal anti-*Leishmania* produzido em camundongos. A técnica revelou positividade em 93,3% das amostras avaliadas (n = 60) (MOREIRA et al., 2002). Em outro trabalho, MOREIRA et al., 2007, realizaram a IFD em amostras de linfonodos na forma de *imprints*, obtendo 92,68% de sensibilidade do teste. Diante dos dados, os autores concluíram que o método de IFD deve ser utilizado para confirmação dos casos suspeitos de LV canina em regiões endêmicas.

Além da carência de artigos científicos que avaliem a sensibilidade da IFD em amostras de pacientes portadores da forma cutânea da leishmaniose, não foram encontrados registros de trabalhos que pudessem ter avaliado a especificidade dos anticorpos policlonais empregados nesta técnica. Tais achados demonstram uma grande lacuna no que diz respeito ao emprego da IFD no diagnóstico da LTA.

1.3.2 ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Testes sorológicos tem sido empregados, com considerável importância, no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos da LTA. As reações de ELISA são utilizadas no diagnóstico de várias doenças e, dentre os testes sorológicos, apresentam grande vantagem por possuírem uma alta sensibilidade e especificidade diagnóstica, dependendo do antígeno utilizado. Além do mais, estas reações apresentam um baixo custo, facilidade técnica e a possibilidade de análise de um grande número de amostras ao mesmo tempo, com rapidez na obtenção de resultados.

Os antígenos mais comumente empregados em ensaios imunoenzimáticos no diagnóstico da leishmaniose são aqueles obtidos a partir do parasito íntegro. PEDRAS et al., 2003, utilizando a reação de ELISA com antígenos brutos de *L. braziliensis* e de *L. amazonensis*, observaram sensibilidade de 94,7 a 100%, respectivamente, e especificidade de 90% e 100% considerando os mesmo antígenos.

FERREIRA et al., 2006 também aplicaram a técnica imunoenzimática empregando antígeno bruto de *L. braziliensis* em soros de pacientes com LTA e obtiveram 85% de sensibilidade. YONEYAMA et al., 2007, obtiveram 93% de

sensibilidade na ELISA com antígeno de *L. braziliensis*, porém, ao avaliar a especificidade desta técnica com amostras de pacientes portadores de doença de Chagas e paracoccidiodomicose, verificou-se apenas 5% e 8,3%, respectivamente.

Os testes imunoenzimáticos, no entanto, possuem limitações que devem ser vencidas. Destaca-se a reatividade cruzada quando utilizados soros de pacientes com doença de Chagas, em função da interação com determinantes antigênicos comuns às espécies de *Trypanosoma cruzi*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* (VEXENAT et al., 1996). MENDES et al., 2007, observaram co-infecção entre *T. cruzi* e *L. braziliensis* em 1% dos indivíduos e que amostras de pacientes chagásicos apresentaram entre 98 e 100% de positividade em ELISA com antígenos de *L. braziliensis* e *L. chagasi*, respectivamente. É provável que a justificativa de tal ocorrência repouse no fato de haver interação com determinantes antigênicos estruturalmente semelhantes. Antígenos brutos, tanto de *L. amazonensis*, quanto de *L. braziliensis*, quando separados por eletroforese e submetidos ao *western blot* demonstraram bandas de alto peso molecular as quais foram reconhecidas quando na presença de soros de pacientes chagásicos (SZARGIKI, 2005).

1.3.2.1 ELISA com antígenos de secreção e excreção produzidos em meio livre de proteínas

Há décadas os antígenos de secreção e excreção de parasitos diversos vem sendo estudados. Os trabalhos mais antigos obtidos em pesquisa remontam à mais de 40 anos quando exo-antígenos de *Trypanosoma cruzi* demonstraram alta especificidade quando empregados na reação de fixação de complemento (TARRANT et al., 1965 apud SHAW e LAINSON, 1975). Em estudos de hipersensibilidade utilizando produtos de secreção de promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* (ADLER et al., 1965 apud SHAW e LAINSON, 1975) e antígenos de secreção de *Leishmania major* (SERGIEV e SHUIKINA, 1969 apud SHAW e LAINSON, 1975) os resultados também apontaram vantagem para os exo-antígenos.

Os exo-antígenos de *L. mexicana amazonensis* foram empregados por SHAW e LAINSON, 1975, em testes intradérmicos que produziram resposta anafilática imediata em pacientes com leishmaniose cutânea confirmada.

A análise molecular de diversos antígenos de leishmânia revelou glicoproteínas de superfície celular como fosfoglicanos gp63, gp46, além de uma glicoproteína lipofosfoglicana chamada KMP11. Outros componentes antigênicos são os glicoinositolfosfolípídeos (GIPL), as chaperonas HSP 60, 70, 83 & STI-1 e as proteínas do citoesqueleto cinesina, tubulina (SOTO *et al.*, 1998), além da actina. Destacam-se as “proteínas conservadas” da família das histonas, subtipo H1, as quais provocam resposta humoral específica em infecções por *L. braziliensis* (CARMELO *et al.*, 2002). Dentre as chaperonas, o grupo das HSP70 demonstra elevada imunogenicidade em leishmanioses (MACFARLANE *et al.*, 1990; ZURITA *et al.*, 2003) além de outras parasitoses.

MARTIN *et al.*, 1998, demonstraram que antígenos liberados (secreção, excreção e metabolismo) são mais específicos que antígenos obtidos por lise das leishmânias para uso em diagnóstico. Estes antígenos, chamados exo-antígenos (exo-Ag), são formados pelos produtos de liberação dos parasitos quando em meio de cultura, também chamados de antígenos solúveis. Eles são liberados de modo semelhante ao que acontece quando da infecção do hospedeiro pela *Leishmania* (RAJASEKARIAH, SMITHYMAN, GUPTA e MARTIN, 2007).

Até o presente momento, houve estudos que trataram de exo-antígenos provenientes de diversas espécies de *Leishmania*. RAJASEKARIAH *et al.*, 2001, avaliaram antígenos secretores, excretos e metabólicos derivados de formas promastigotas de *L. donovani*, cultivadas em meio livre de proteínas. Preliminarmente, os antígenos foram separados em gel pela eletroforese (SDS-PAGE). A visualização pela coloração com Coomassie (Figura 2) revelou bandas de diversos tamanhos: 11, 30, 42, 50 e 161 kDa, demonstrando uma complexidade de antígenos protéicos.

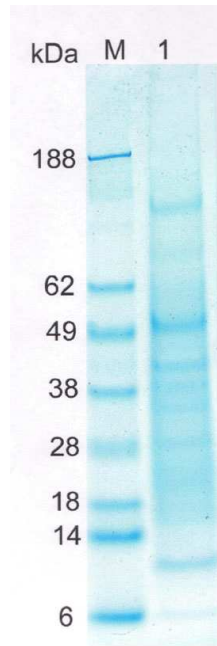


Figura 2 – Eletroforese em gel de SDS-PAGE. Exo-antígenos de formas promastigotas de *L. donovani* separados por eletroforese em gel de gradiente 4-12% e visualização com Comassie coloidal G-250. M: marcadores de peso molecular pré-diluídos de 3 a 188 kDa. (Fonte: RAJASEKARIAH et al., 2001. *Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens*, **J. Immunol. Methods**, 252(1-2): 105-19, 2001).

Os exo-antígenos são obtidos a partir de cultura positiva para leishmânias em meio Schneider com soro fetal bovino a 10%. Após centrifugação, este meio é removido e as leishmânias são ressuspensas em meio XOM (tampão com colóide osmótico) que mantém a integridade da membrana das formas promastigotas. Após 3 dias de nova incubação a 26°C, a cultura (contendo 90% de formas promastigotas viáveis) é dividida em frascos e centrifugada a 5.000g. O sobrenadante é reservado e o sedimento é desprezado. Por fim, o sobrenadante é clarificado por meio de passagem em filtro com poros de 0,22 µm e armazenado a 4°C. Este produto final tem sua concentração medida e está pronto para uso na sensibilização dos poços da placa de ELISA.

Objetivando o diagnóstico da leishmaniose cutânea (LC), RYAN et al., 2002, avaliaram a reação de ELISA baseada nos antígenos de promastigotas de *L. mexicana* cultivadas em meio livre de proteínas, para a detecção de imunoglobulinas IgM e IgG

em soros de 143 pacientes (brasileiros) com LTA confirmada. Os resultados mostraram sensibilidade de 92,3%. No mesmo trabalho, os autores verificaram que soros de 10 pacientes portadores de LTA apresentaram reatividade ao exo-antígenos de *L. mexicana* utilizando *western blot* (Figura 3).

Em 2008, RAJASEKARIAH e colaboradores compararam a metodologia imunoenzimática com exo-antígenos de *L. donovani* e de *L. major* com outras técnicas (Hemaglutinação direta, imunofluorescência indireta e métodos parasitológicos) para o diagnóstico de LV em cães. Os autores constataram maior sensibilidade (100%) do ELISA frente às demais metodologias.

Desta forma, de acordo com os resultados acima, nota-se que o ELISA utilizando os exo-antígenos de leishmânias cultivadas em meio livre de proteínas apresenta-se como um método aperfeiçoado, uma vez que houve aumento da sensibilidade, tornando promissor para sua inclusão em rotina de diagnóstico da LTA em instituições de saúde.

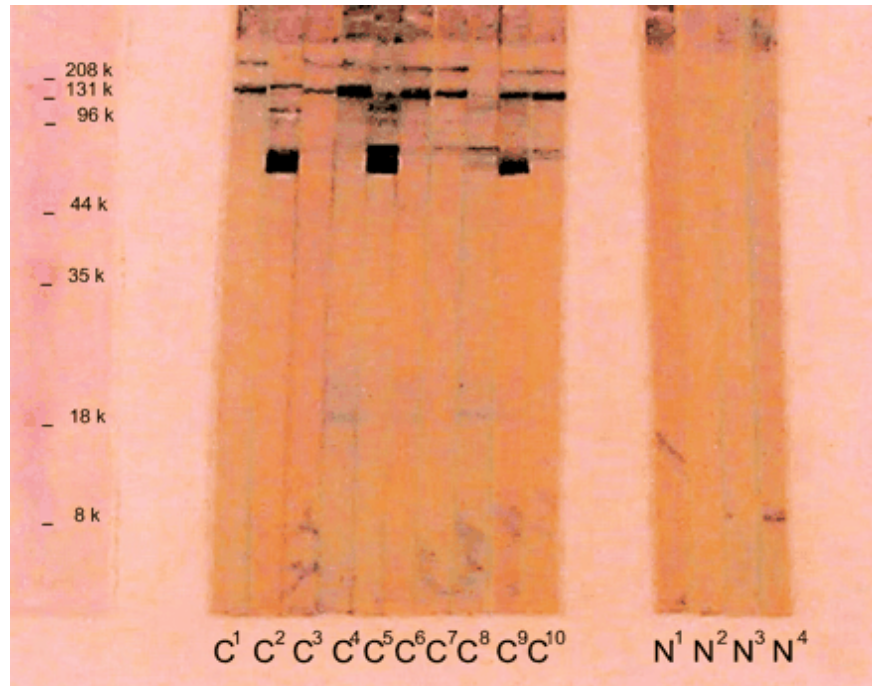


Figura 3 – Reação de *western blot* demonstrando sororreatividade entre amostras de 10 pacientes portadores de leishmaniose cutânea (C1 a C10) e os exo-antígenos de *L. mexicana* versus soros controle (pacientes sadios, de N1 a N4) que não apresentaram reação frente aos mesmos antígenos. (Fonte: Ryan et al., 2002. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Base don Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and Antibidies in sere from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis*. **J. Clin. Microbiol.**,v. 40, nº 3, 1037-1043, 2002).

Os dois métodos propostos pertencem à empresa Cellabs PTY (Brookvale, Austrália). Graças aos bons resultados dos testes de ELISA exo-Ag e de IFD no diagnóstico de LC causada por outras espécies de *Leishmania* conforme trabalhos publicados, a referida empresa demonstrou interesse de mercado no Brasil. Por meio do seu pesquisador chefe, Dr. G-Halli Rajasekariah, houve interesse mútuo num trabalho que avaliasse os parâmetros de validação da ELISA exo-Ag e da IFD para o diagnóstico da LTA no Brasil, culminando no assunto que trata esta tese.

OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Validar, por meio de indicadores (sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivo e negativo), os exo-antígenos de formas promastigotas de *L. mexicana* em ensaio imunoenzimático (ELISA exo-Ag) e os anticorpos policlonais da imunofluorescência direta (IFD) para o diagnóstico da LTA.

2.2 – Objetivos específicos

- Determinar os indicadores de validade dos exo-antígenos de *L. mexicana* em ensaio imunoenzimático (ELISA exo-Ag);
- Determinar os indicadores de validade dos anticorpos policlonais da IFD;
- Identificar, pela técnica de PCR-RFLP, as espécies de *Leishmania* causadoras da LTA nos pacientes incluídos no estudo;
- Calcular os custos das técnicas de rotina e de cada técnica proposta (ELISA exo-Ag e IFD) para comparação e avaliação da relação custo-benefício.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Tipo de estudo

Trata-se de estudo de validação de testes diagnósticos comparados com métodos utilizados na rotina (cultura, pesquisa direta de formas amastigotas, IRM, RIFI e exame histopatológico).

3.2 - População estudada e definição de caso

Os pacientes incluídos foram atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), para os quais houve posterior confirmação do diagnóstico de LTA por meio de dados epidemiológicos, clínicos e da positividade em pelo menos 2 testes laboratoriais de rotina (cultura, pesquisa direta de formas amastigotas, IRM, RIFI e exame histopatológico), durante o período compreendido entre agosto de 2007 a julho de 2010.

3.3 – Tamanho da amostra populacional

O número de pacientes estudados, considerando as sensibilidades do método de ELISA descritas na literatura, utilizando grau de confiança de 95% e uma precisão de 5%, deveria ser de pelo menos 73 pacientes. Quando o parâmetro a ser avaliado é a especificidade do ELISA, o número de pacientes não portadores de LTA a serem incluídos para os testes sorológicos deveria ser de 73 pacientes, levando em conta precisão de 5% com um grau de confiança de 95%.

Para a IFD, de acordo com as sensibilidades descritas por outros autores e considerando 75% de grau de confiança e precisão de 10%, o número de pacientes que devem ser incluídos para estabelecimento da sensibilidade deveria ser de 72 pacientes. Visando a especificidade, cujo grau de confiança seja de 95% e precisão de 6%, o número de pacientes sem LTA a serem incluídos deveria ser de 51 pacientes.

Para os cálculos acima, foi utilizada equação aplicada a teste de hipótese para uma proporção, disponível em software Epi Info, versão 3.3.2 (CDC, Geórgia, EUA).

3.4 – Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico de LTA, nas formas cutânea e cutâneo-mucosa, confirmado pela história epidemiológica e clínica, além da positividade em pelo menos 2 testes laboratoriais de rotina; pacientes virgens de tratamento ou aqueles com recidiva da doença, mas que não foram submetidos a tratamento específico para LTA nos 6 meses anteriores à coleta das amostras; pacientes que concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento.

3.5 – Critérios de exclusão

Pacientes menores de idade (menos de 18 anos) cujos pais não assinaram o Termo de Consentimento e aqueles maiores de idade que não aceitarem assinar o mesmo; pacientes em uso ou que receberam tratamento específico para LTA até 6 meses anteriores à coleta das amostras; pacientes com sorologia positiva ou com história clínica de doença de Chagas.

3.6 – Obtenção das amostras

No projeto em tela, para a realização dos testes de ELISA, foram utilizados 2 (dois) ml de soro dos pacientes obtidos por punção venosa, coletadas quando do procedimento de rotina para diagnóstico de LTA, no ambulatório de Dermatologia do HUB. Após retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas e mantidas em tubos devidamente identificados, em freezer a - 20° C negativos, para a realização da RIFI e do ELISA exo-Ag.

Antes da realização dos testes de ELISA exo-Ag, cada amostra (soro) foi submetida à sorologia para pesquisa de anticorpo IgG contra *T. cruzi* com kit imunoenzimático específico (Chagatest ELISA recombinante v4, Wiener lab, Rosário, Argentina). As amostras que apresentaram reações positivas (com absorbância acima do ponto de corte conforme kit) foram excluídas dos testes para pesquisa de anticorpo anti-*Leishmania* pelo método de ELISA com exo-Ag a fim de evitar o viés da conhecida reatividade cruzada.

Para os testes de IFD, foram obtidos fragmentos de tecido cutâneo por meio de procedimento cirúrgico (biópsia) no local da lesão, empregando “punch” de 4 (quatro) mm. Este procedimento foi realizado por médicos residentes em Dermatologia do

HUB. Os fragmentos foram comprimidos contra lâminas de vidro (6 compressões por lâmina; 2 lâminas por paciente), com auxílio de uma pinça, a fim impregná-las com material linfático. As lâminas foram identificadas e guardadas para posterior fixação.

3.7 - Exames de rotina para o diagnóstico da LTA

3.7.1 - Intradermorreação de Montenegro

Inoculou-se 0,1ml do antígeno* (Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos – CPPI, Piraquara, Paraná, Brasil) por via intradérmica na face anterior do antebraço esquerdo, a 3 cm da prega cubital. Foram consideradas positivas as reações com pápulas iguais ou superiores a 5x5 mm (OLIVEIRA et al., 1995; SANTOS et al., 2005). A leitura da endureção foi realizada por enfermeiro treinado do Serviço de Dermatologia do HUB, 48 horas após aplicação do antígeno.

3.7.2 – Exame histopatológico

Após antissepsia local, foi aplicado anestésico xilocaína a 2%. A incisão foi feita na borda da lesão com “punch” de 4 (quatro) mm. O fragmento foi colocado em solução de formol a 10%, em quantidade aproximadamente 20 vezes maior que o volume do fragmento. No exame histopatológico, a lâmina foi corada pela hematoxilina-eosina e pelo método May Grunwald-Giemsa (STOLF et al., 1993), sendo o teste positivo quando constatada a presença de formas amastigotas em meio a quadro inflamatório tecidual específico.

3.7.3 - Pesquisa direta de formas amastigotas em lâmina

Após identificação de cada paciente em 2 lâminas, o fragmento biopsiado foi pressionado contra a lâmina de vidro em 6 pontos diferentes por lâmina. Seguiu-se a fixação com metanol e coloração com Giemsa por 30 minutos (ASHFORD, 2000; IKEDA-GARCIA E FEITOSA, 2006). Depois, procedeu-se a lavagem e secagem. As lâminas foram observadas em microscópio óptico em objetiva de 40 e 100x. Em caso de encontro de formas amastigotas intracelulares, o exame era considerado positivo. Este método é comumente chamado de “esfregaço” no meio clínico.

* O antígeno é composto por *L. (L.) amazonensis* (Cepa referência OMS MHOM/BR/73/PH8) em concentração de 40µg/ml de nitrogênio protéico, 0,005g/ml de fenol, 0,0098g/ml de cloreto de sódio e água destilada q.s.p. 1ml.

3.7.4 - Cultura do aspirado de lesão

Realizou-se aspiração na borda da lesão (local da biópsia) com seringa contendo 300 µL de solução fisiológica estéril e antibiótico (gentamicina a 0,2%). O aspirado foi dividido em 2 tubos com meio NNN (150 µL em cada) seguindo orientações de ROMERO *et al.*, 2002. As tampas foram previamente limpas com gaze e álcool 70%. Os tubos foram conservados em estufa 24-26°C e o material observado ao microscópio invertido (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) diariamente, até 30 dias. A positividade era dada pelo encontro de formas promastigotas no meio.

3.7.5 - Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Este método baseia-se na reação de anticorpos do tipo IgG contra leishmânias fixadas em lâmina (MHOM/BR/PH8 de *L. (L.) amazonensis*) presentes no soro diluído 1:20 (triagem), 1:40, 1:80 e, conforme necessidade, em diluições superiores. Numa etapa posterior, essa reação foi evidenciada graças à adição de conjugado fluorescente que permite a visualização em microscópio de luz azul e ultra-violeta, no comprimento de onda de 490nm, segundo Chiari, 1973. São consideradas reagentes as amostras que apresentaram fluorescência amarelo-esverdeada e não-reagentes aquelas que não apresentaram fluorescência ou os parasitos mostraram-se avermelhados. O resultado foi expresso em título de diluição, sendo consideradas positivas na diluição 1:40 em diante.

O conjugado aqui utilizado é um anti-IgG humano marcado com isotiocianato de fluoresceína, produzido pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ (Bio-manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil), pré-diluído 1:150 em solução de Azul de Evans a 0,1%.

A leitura da imunofluorescência foi realizada em fotomicroscópio com lâmpada tipo HB200 e filtro BG12 (Axiolab RE, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha).

3.8 – Testes propostos (ELISA exo-Ag, IFD) e identificação das espécies de *Leishmania*

3.8.1 - ELISA com exo-antígenos (ELISA exo-Ag)

O kit para teste de ELISA exo-Ag é constituído por:

- Microplaca com poços revestidos com exo-Antígenos de *Leishmania* cutânea: 1 microplaca cada uma contendo 12 tiras quebráveis com 8 poços recobertas com exo-Antígenos de *Leishmania* cutânea. Cada placa é empacotada em uma bolsa de alumínio que contém duas bolsas de polietileno com dessecante gel sílica.
- Conjugado Enzimático IgG Concentrado 100x: 1 frasco com 0,2 mL que contém conjugado anti-humano IgG marcado com a enzima peroxidase rábano em tampão protéico básico (Soro Albumina Bovina a 5% p/v) e azida sódica a 0.09% como preservante. Dilua o conjugado 1:100 com o tampão de lavagem antes do uso.
- Cromógeno TMB 20x: 1 frasco que contém 1,5 mL de tampão substrato (peróxido de hidrogênio) e cromógeno (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) e azida de sódio a 0.09% como preservante.
- Solução de Lavagem Concentrada PBS/Tween 20x: 1 frasco que contém 110 mL de solução tampão salino - PBS 20 vezes concentrado em detergente não iônico Tween 20 e azida sódica a 0.09% como preservante.
- Tampão do Substrato: 1 frasco que contém 24 mL de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 0,5% diluído em tampão fosfato citrato 0,1% em azida de sódio a 0.09% como preservante.
- Solução Bloqueadora: 1 frasco que contém 12 mL de ácido sulfúrico a 10,7%.

3.8.1.1 - Princípio do teste

O teste consistiu em um método imunoenzimático de fase sólida. Exo-antígenos da forma promastigota de *L. mexicana* foram solubilizados e aderidos à fase sólida da placa de ELISA. Estes antígenos ligaram-se a anticorpos específicos da amostra dos pacientes. Um conjugado anti-IgG humano foi acrescentado ao teste para aderir a reação antígeno-anticorpo. A reação foi revelada por um substrato cromógeno. Uma vez presente o anticorpo contra a leishmânia, a reação foi evidenciada por meio da

coloração desenvolvida pela ligação conjugado/substrato. A intensidade da reação foi proporcional à quantidade de anticorpos presente, medida em espectrofotômetro.

Para as reações de ELISA foi empregado kit produzido somente para pesquisa, desenvolvido pelo laboratório Cellabs, Austrália. Deve ser ressaltado que este laboratório trabalha com diagnósticos de doenças negligenciadas, basicamente as infecto-parasitárias, que possuem maior prevalência nos países em desenvolvimento.

3.8.1.2 - Metodologia do teste

- Soros dos pacientes e os controles positivo e negativo foram diluídos 1:200 com a solução de lavagem e pipetados em placa de ELISA pré-sensibilizada com antígenos secretor, excretor e metabólico provenientes de *L. mexicana*;
- Seguiu-se incubação por 60 minutos em câmara úmida;
- Após lavagem com PBS + Tween 20 a 0,05% por 4 vezes, foi adicionado conjugado anti-IgG humano (diluído 1:100 em solução de lavagem);
- A placa foi novamente incubada por 30 minutos à temperatura ambiente;
- Nova lavagem com PBS-Tween por 4 vezes;
- Foi adicionado 1mL do substrato-cromógeno (TMB), pré-diluído no tampão substrato, e a placa imediatamente coberta com papel alumínio;
- Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, 100 µL da solução de parada (H₂SO₄) foi adicionada à cada poço;
- A reação foi evidenciada em leitor de ELISA (Spectramax Plus, Molecular Devices, CA, USA), com filtro de absorvância de 450/620 ou 450/650.

3.8.2 - Imunofluorescência Direta (IFD)

O kit para realização da IFD possui:

- Reagente 1: conjugado IgG concentrado 1:50. 1 frasco com 1,25 mL que contém solução de conjugado IgG anti-*Leishmania* marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC).
- Reagente de montagem: 1 frasco que contém 2,5 mL de solução de glicerina e azul de Evans, em meio alcalino.

3.8.2.1 - Princípio do teste

O teste de imunofluorescência direta é empregado na pesquisa de antígenos em células por meio de anticorpo específico marcado com fluorocromo (conjugado). O conjugado se fixa ao antígeno, formando um imunocomplexo estável. O anticorpo não ligado é removido por lavagens e o preparado é observado em microscópio de fluorescência (Figura 4).

Na reação de IFD foram utilizados kits que contêm: 1 frasco com anticorpo policlonal marcado com fluorocromo, 1 frasco de líquido de reação e 1 frasco de tampão para diluição do anticorpo.

3.8.2.2 - Metodologia do teste

- A amostra de tecido cutâneo foi retirado da lesão do paciente por procedimento cirúrgico (biópsia), com auxílio de “punch” de 4mm;
- O fragmento cutâneo foi comprimido contra lâmina de vidro com auxílio de uma pinça, sendo realizadas 6 compressões por lâmina e 2 lâminas por paciente;
- Após secagem, as lâminas foram fixadas com acetona em banho de gelo, durante 20 segundos e realizada nova secagem de forma natural;
- As lâminas foram guardadas envoltas por papel alumínio, à temperatura de -30°C, aguardando confirmação do diagnóstico de LTA do respectivo paciente;
- Após confirmação da LTA, as lâminas foram descongeladas;
- Foram adicionados 25 µL do anticorpo diluído 1:20 sobre cada *imprint* das 2 lâminas;
- Seguiu-se incubação por 30 minutos à 37°C;
- Após lavagem com solução fisiológica e secagem da lâmina, foi adicionado uma gota do líquido de montagem e coberta com lamínula;
- A leitura da reação foi realizada em microscópio de imunofluorescência (Axiolab RE, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), em objetiva de 40x, tendo sido observados 20 campos em cada um dos 6 imprints, totalizando 120 campos por lâmina.



Figura 4 – Técnica de imunofluorescência direta para pesquisa de leishmânia em lâmina em 4 momentos. A: Kit “Leishmania cel”; B: tampão e conjugado policlonal produzidos e enviados gentilmente pela empresa Cellabs para este estudo; C: acetona em banho de gelo para fixação das lâminas coletadas pós-biópsia do paciente; D: lâminas com 6 *imprints* de tecido de lesão cutânea após incubação e prontas para leitura ao microscópio de fluorescência.

3.8.3 – Conflito de interesses

O conflito de interesses foi previsto neste projeto e, por isso, a orientadora, Profa. Dra. Raimunda Nonata, solicitou à empresa Cellabs documento (ANEXO 3) no qual a mesma afirma não possuir conflito de interesses com o referido projeto, independente dos resultados que o mesmo possa vir a obter.

3.8.4 - Reação da polimerase em cadeia e análise de polimorfismo de fragmentos de DNA (PCR-RFLP)

3.8.4.1 - Princípio do teste

Sequências de DNA (*primers*) complementares às regiões conservadas presentes no k-DNA (cinetoplasto) do parasito se ligam e possibilitam a amplificação dessas regiões em aparelhos termocicladores, na presença de reagentes específicos. O produto dessa amplificação em número e tamanho revela o grau de polimorfismo do DNA, que é característico de determinadas espécies ou subgêneros, possibilitando a classificação taxonômica da espécie, ou, neste caso, do subgênero do parasito causador da leishmaniose.

Para cada paciente no qual foi realizada biópsia, procedeu-se a coleta da amostra do tecido cutâneo da lesão. Este foi pressionado contra papel de filtro em 3 pontos diferentes e, após secagem, foi acondicionado em envelope e guardado sob refrigeração.

3.8.4.2 - Metodologia do teste

A técnica segue conforme indicado por VOLPINI, et *al.*, 2004, com modificações:

- Extração de DNA total dos isolados de leishmânia:

As amostras em papel de filtro foram recortadas com bisturi e colocadas com auxílio do mesmo instrumento em frasco eppendorf previamente identificado. Em seguida, o material nucléico foi extraído da amostra utilizando 30 microlitros de água estéril (injeção), agitação em aparelho tipo vortex e posterior aquecimento à 96°C por 10 minutos.

- Obtenção de fragmentos parciais de DNA via reações de PCR:

Foram utilizados oligonucleotídeos para amplificar as regiões conservadas dos minicírculos de kDNA de *Leishmania*, sendo esperado a obtenção de fragmentos de 120 pb para *L. (V.) braziliensis* e 116 pb para *L. (L.) amazonensis*. Sequências dos oligonucleotídeos: oligo 150: 5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3' e oligo 152: 5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC 3' (PASSOS *et al.*, 1996). As reações de PCR ocorreram em termociclador (PX2 Thermal Cycler, Thermo Fisher Cientific, MA, USA). As reações foram realizadas com 1µM de cada oligonucleotídeo, 200µM de dNTPs, incluindo

dUTP e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), tampão (10 μ M tris-HCl pH 8,6, 50 μ M KCl, 1,5 μ M MgCl₂) e 5 μ L do extraído (DNA) em um volume final de 23 μ l por tubo;

- Revelação da PCR:

O volume de 5 μ L do amplificado foi misturado à 2 μ L de tampão de corrida contendo corante xileno-cianol e aplicado em gel de agarose 2%, imerso em tampão TBE 1x. Para balizamento, utilizou-se marcador de peso molecular de 100pb na concentração 1 μ g/ μ L (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A corrida eletroforética teve como parâmetros: tempo de 90 minutos, 90 V e 400 mAmp. O gel foi visualizado em fotodocumentador com luz UV (EC3 Imaging System, UVP, CA, USA).

- As amostras cuja revelação da PCR forneceram positividade, foram digeridas, utilizando enzima *HAE* III (Biolabs, NE, USA), utilizando 5 μ L do material amplificado, durante a noite a 37°C. As amostras que evidenciaram bandas fracas na PCR foram amplificadas novamente, porém com volume maior (7 μ L) do extraído do papel de filtro. Aquelas que mostraram aumento na intensidade das bandas, foram consideradas positivas e seus *amplicons* digeridos pela enzima de restrição.
- Seguiu-se a análise dos fragmentos por meio da técnica de RFLP em comparação com amostras controle e com marcadores de peso molecular, após clivagem dos fragmentos obtidos via PCR por digestão com endonuclease de restrição. A análise foi precedida pela separação das bandas por eletroforese em gel de poliacrilamida corada por nitrato de prata.

Os testes de PCR-RFLP foram realizados no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo), sob orientação da Profa. Dra. Ana Maria Ferreira Roselino.

3.9 – Amostras para determinação da especificidade

3.9.1 – Amostras de pacientes aparentemente saudáveis e sem LTA

Como controles negativos para ELISA *exo-Ag* foram utilizados soros de 80 indivíduos que não possuíam história clínica de leishmaniose, que não estiveram em região endêmica ou rural por, pelo menos, 24 meses anteriores à coleta da amostra e, aparentemente, saudáveis.

Para a IFD, foram empregadas lâminas de 55 pacientes contendo impregnações (6 por lâmina) de fragmento de lesão cutânea retirado por biópsia de pacientes cuja hipótese diagnóstica não foi LTA. O descarte da hipótese de LTA se deu perante a análise de dados clínicos, epidemiológicos e/ou laboratoriais.

3.9.2 – Amostras de pacientes portadores de outras doenças

A reatividade cruzada entre leishmaniose e doença de Chagas ao teste de ELISA *exo-Ag* foi posta à prova frente a amostras de pacientes chagásicos ($n = 24$), além de uma amostra como controle negativo. Os soros foram obtidos junto ao Laboratório Multidisciplinar de Doença de Chagas da FM/UnB, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Antônio Teixeira. O quadro clínico da doença de Chagas foi confirmado por exames clínicos e laboratoriais (RIFI e PCR) e todas as amostras eram provenientes de pacientes em fase crônica da moléstia.

Testou-se também o kit de ELISA *exo-Ag* em amostras de pacientes portadores de pêfego foliáceo ($n = 13$), uma vez que a doença é caracterizada por um desequilíbrio do sistema imunológico, além da especulação ainda existente sobre a origem infecciosa, não comprovada até o momento. Os soros foram obtidos de pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB com diagnóstico confirmado pela história, exames clínicos e histopatológico,.

O kit de ELISA com *exo-Ag* foi testado com soros de pacientes sabidamente portadores de doenças reumáticas ($n = 33$), tais como lúpus eritematoso sistêmico, gota e reumatismos diversos. Além da doença em si, outro parâmetro verificado para inclusão da amostra nesta etapa foi a presença de positividade em pelo menos um dos testes para marcadores reumáticos, como anti-estreptolisina O (ASO), proteína C reativa

(PCR) e fator reumatóide (FR). As amostras foram colhidas de pacientes do Ambulatório de Reumatologia do Hospital de Força Aérea de Brasília, após esclarecimentos sobre o objetivo do trabalho, seguidos da assinatura do termo de consentimento pelo paciente.

Foram colhidos também soros de pacientes portadores do mal de Hansen na forma virchowiana (n = 9) para submissão ao teste de especificidade do ensaio imunoenzimático com exo-Ag. Cada paciente, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB, foi diagnosticado com base em critérios clínicos e pelos métodos de rotina (baciloscopia em material linfático e exame histopatológico).

Ainda visando análise da especificidade do ELISA exo-Ag, foram utilizados soros de pacientes com micoses profundas (n = 9) atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB, cujo diagnóstico deu-se em função de critérios clínicos e por métodos de diagnóstico laboratorial (cultura ou exame direto). Por fim, soros com reação VDRL (*Veneral Disease Research in Laboratory*) positiva na diluição mínima 1:8 (n = 16), obtidos no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Força Aérea de Brasília, foram testados pelo ELISA exo-Ag também para fins de especificidade.

3.10 – Análise estatística

Os indicadores de validade previstos para estudo foram calculados. A obtenção dos valores da sensibilidade e da especificidade do teste de ELISA exo-Ag e da IFD seguiu a matriz para cálculo de indicadores para testes sorológicos (GUIMARÃES et al., 1987) (Tabela 1).

Tabela 1 – Matriz para cálculo dos indicadores para as reações de ELISA com exo-antígenos e de Imunofluorescência Direta em portadores de LTA

TESTE	PACIENTES COM LTA	PACIENTES SADIOS OU PORTADOR DE OUTRA PATOLOGIA	TOTAL
Reagente	a	c	a + c
Não reagente	b	d	b + d
TOTAL	a + b	c + d	a + b + c + d

Foi considerada sensibilidade estimada de 95%, especificidade estimada de 95%, nível de confiança de 95% e precisão de 4% (ELISA exo-Ag) e 6% (IFD), a partir do número de pacientes obtidos para consecução deste trabalho.

As sensibilidades (S) da ELISA exo-Ag e da IFD foram dadas pelos números de amostras reagentes dentro da totalidade das amostras, mediante equação: $S = a/a + b$.

As especificidades (E) dos métodos em estudo foram calculadas quando da submissão de amostras de pacientes sadios e também de amostras de pacientes portadores de doenças diversas ao teste proposto (neste caso, somente ao ELISA exo-Ag), por meio da equação: $E = d/c+d$. Para o cálculo da especificidade do método de IFD, foram realizados testes em lâminas de pacientes com lesão cutânea, porém, com hipótese diagnóstica não LTA.

A acurácia (A) é a proporção de testes verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos em relação à totalidade dos resultados. Para cada um dos 2 testes propostos foram calculadas suas respectivas acurácias, utilizando para tal a equação: $A = a + d/a + b + c + d$.

Foram calculadas também as prevalências intervalares a fim de determinar os limites entre os quais são admitidas as frequências verdadeiras da amostra contida, com 95% de confiança. Com este intuito, utilizou-se da equação de prevalência intervalar: $P \pm 1,96 \sqrt{P(1-P)/n}$, onde P depende da sensibilidade e n depende da quantidade de pacientes incluídos.

Os valores preditivos positivo e negativo para cada um dos testes propostos foram calculados. Para o valor preditivo positivo, foi empregada a equação $a/a + c$. O cálculo do valor preditivo negativo deu-se por meio da equação $d/b + d$.

Os demais testes de rotina e a PCR também tiveram suas respectivas sensibilidades calculadas de acordo com a positividade dos mesmos frente à totalidade de amostras avaliadas. Foram empregadas, portanto, as mesmas equações para cálculo de S e E e seus respectivos intervalos.

3.11 Mensuração dos custos de cada técnica e avaliação do custo-benefício

O custo de cada método de rotina para a LTA foi realizado com base em dados tangíveis, obtidos em pesquisa de mercado, cotações e em documentos fiscais com data de validade inferior a 1 ano.

Foram considerados valores unitários dos insumos hospitalares utilizados na coleta de amostras, tais como seringas, agulhas, tubos a vácuo, lâminas de vidro, pote de plástico e solução de formol. Na confecção dos exames, outros itens foram precificados, tais como: meio de cultura, reagentes para imunofluorescência indireta, corantes e soluções fixadoras.

Ao final, os preços das duas técnicas propostas foram comparados com aqueles referentes aos métodos de rotina. A comparação foi realizada de forma separada e conjunta a fim de permitir melhor discussão e avaliação da relação custo-benefício.

RESULTADOS

IV – RESULTADOS

O período de acompanhamento junto ao Ambulatório de Dermatologia do HUB, inicialmente previsto para 24 meses, foi estendido para 36 meses. A justificativa foi o incremento no número de pacientes portadores de LTA e de outras doenças e, portanto, aumento no número de amostras obtidas a fim de aumentar a precisão dos resultados.

Os dados clínicos e epidemiológicos de cada paciente foram reunidos em Ficha de Atendimento de Pacientes (ANEXO 2), a qual, na maioria das vezes, teve o preenchimento completado após atendimento do paciente, mediante pesquisa em prontuário respectivo. Desta forma, na falta de algumas informações foi anotado “Não Informado (NI)” ou quando o prontuário não fora localizado anotou-se “Prontuário Não Encontrado (PNE)” nos campos específicos.

4.1 – Dados gerais dos pacientes incluídos

Ao todo, 106 pacientes foram incluídos no trabalho após confirmação do diagnóstico da LTA por critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

Contudo, as amostras colhidas não correspondem à totalidade dos mesmos. Em 4 pacientes o soro não foi obtido e, por conseguinte, não puderam ser incluídos na realização do teste de ELISA proposto. Trinta e quatro pacientes não tiveram *imprints* em lâminas de vidro coletados para a realização da IFD. Quarenta e três pacientes não tiveram *imprint* em papel de filtro coletados, visando a consecução da PCR.

Quanto ao número de pacientes para satisfação dos valores de graus de confiança e de precisão, tanto para o ELISA *exo-Ag* como para a IFD, foram atingidas as quantidades mínimas de pacientes:

- ELISA *exo-Ag*: sensibilidade (n = 98) e especificidade (n = 80).
- IFD: sensibilidade: (n = 72) e especificidade (n = 51).

4.2 – Dados epidemiológicos dos 106 pacientes portadores de LTA

Quanto aos dados epidemiológicos, observou-se: predomínio de pacientes do sexo masculino; procedentes do próprio DF; de faixa etária dos 21 aos 30 anos de idade; e com ocupação relacionada ao trabalho rural. Cabe chamar a atenção para a tabulação

das idades em faixas etárias a fim de estratificar os pacientes em grupos os quais permitem melhor análise social e epidemiológica quando da discussão.

Os dados aqui citados estão expostos na Figura 6 e Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente. Para o aspecto procedência, considerou-se o local onde o paciente declarou residência.

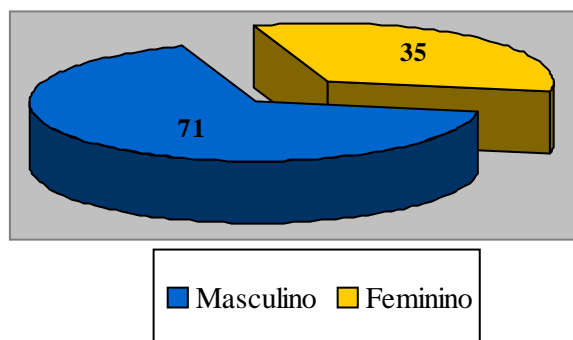


Figura 5 – Resultado quanto ao sexo dos 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010 e incluídos no presente trabalho.

Tabela 2 – Resultado quanto à faixa etária dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010 e incluídos no presente trabalho

Faixa etária	Nº	%
Até 10 anos	5	4,7
11-20	8	7,5
21-30	22	20,8
31-40	17	16
41-50	20	18,9
51-60	19	17,9
Acima de 60 anos	15	14,2
Total	106	100

Tabela 3 – Resultado quanto à ocupação dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010 e incluídos no presente trabalho

Ocupação	Nº	%
Não relacionadas à atividade no campo	24	22,6
Relacionada a atividade no campo (Lavrador/Professor*/Biólogo*/Técnico agropecuário)	52	49,1
Aposentados/desempregados/inválidos	14	13,2
NI	16	15,1
Total	106	100

*Nestes casos, os pacientes relataram trabalharem no campo.

NI: Não Informado.

Tabela 4 – Resultado quanto à procedência (endereço de residência) dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010 e incluídos no presente trabalho

Procedência	Nº	%
Distrito Federal	74	69,8
Goiás	19	17,9
Mato Grosso	3	2,8
Bahia	2	1,9
Outros estados	3	2,8
NI	5	4,7
Total	106	100

NI: Não Informado.

A Figura 5 evidencia o predomínio de pacientes do sexo masculino, cujo número relativo é de 67% contra 33% de pacientes do sexo feminino. Nota-se, após análise da Tabela 2, que a faixa etária mais acometida é aquela que vai de 21 aos 30 anos, com quase 21% dos pacientes incluídos neste trabalho. Faz-se necessário registrar que 6 (5,7%) pacientes eram crianças, com idades que variaram de 3 a 11 anos de idade. O paciente mais velho incluído no trabalho proposto possuía 83 anos quando do atendimento.

Outro dado importante é mostrado na Tabela 3, onde 52 (49,1%) pacientes relataram ocupação relacionada à atividade no campo, tais como lavradores, técnicos agropecuários, biólogos e professores universitários que realizavam trabalho em área rural.

A maioria dos pacientes (69,8%) relatou residência no Distrito Federal, seguido de Goiás e demais estados, conforme Tabela 4. Porém, nota-se que quando o parâmetro é o local de provável contágio (relatado pelos pacientes), o Estado de Goiás apresenta o maior número de casos, seguido pelo DF, Bahia e Minas Gerais (Tabela 5). Dentre os “Outros estados” na mesma tabela, quanto ao local de provável contágio, temos Rondônia, Acre, Tocantins, Amazonas, Amapá e Pará.

Tabela 5 – Resultado quanto ao local de provável contágio, conforme relato dos 106 pacientes portadores de LTA atendidos no HUB no período entre agosto de 2007 a julho de 2010 e incluídos no presente trabalho

Local de provável contágio	Nº	%
Goiás	30	28,3
Distrito Federal	16	15,1
Bahia	11	10,4
Minas Gerais	11	10,4
Mato Grosso	7	6,6
Maranhão	4	3,8
Outros estados	10	9,4
NI	17	16,0
Total	106	100

NI: Não informado.

No intuito de verificar de forma mais detalhada os locais de provável infecção, tanto no DF quanto a região do Entorno, foram montadas as Figuras 6 e 7, respectivamente, as quais mostram os casos de LTA por local de provável contágio relatado pelos pacientes.

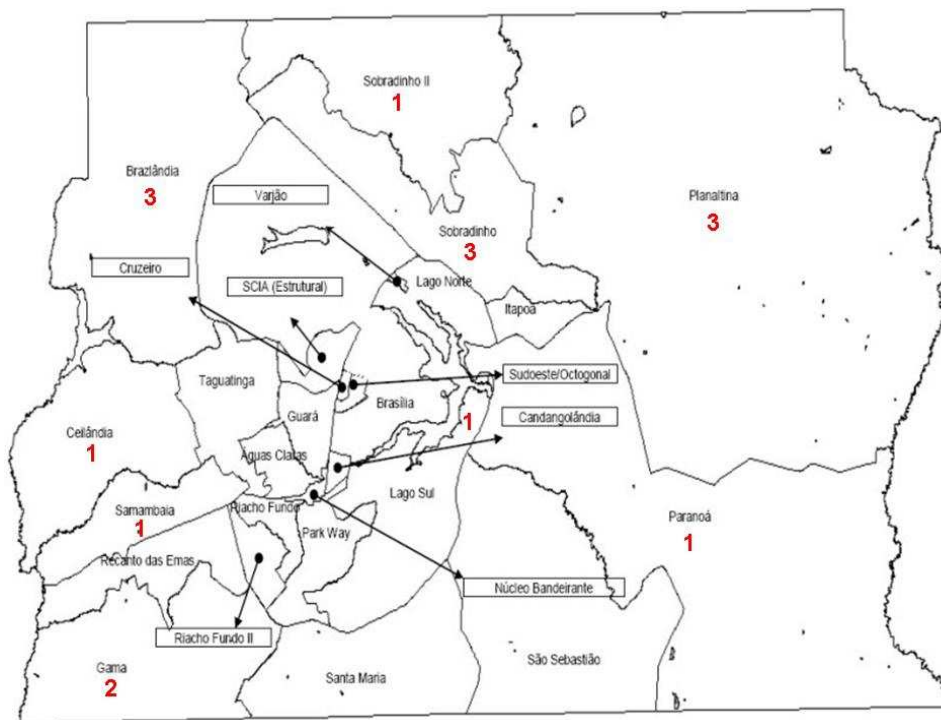


Figura 6 – Distribuição, por região administrativa de provável contágio, de 16 pacientes portadores de LTA, procedentes do DF, atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010 (Fonte: SEPLAN-DF, com adaptações).



Figura 7 – Distribuição, por cidade de provável contágio, de 30 pacientes portadores de LTA, procedentes do Entorno do DF e atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010 (Fonte: SEPLAN-DF, com adaptações).

4.3 – Dados clínicos dos 106 pacientes portadores de LTA

As Tabelas de 6 a 11 apresentam os dados clínicos coletados e dizem respeito às formas da LTA e às variáveis de manifestação (tempo, tipo, localização e número de lesões).

Tabela 6 – Resultado quanto à forma clínica da LTA em 106 pacientes atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010

Forma clínica	Nº	%
Cutânea	90	84,9
Mucosa	16	15,1
Total	106	100

Tabela 7 – Resultado quanto ao relato da ocorrência da lesão cutânea, se pela primeira vez ou se recidiva, em 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010

Situação da LTA	Nº	%
Primeira vez	88	83,0
Recidiva	12	11,0
NI	6	5,7
Total	106	100

NI: Não informado.

Tabela 8 – Resultado quanto ao número de lesões por paciente, em 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010

Quantidade de lesões por paciente	Nº	%
Única	75	70,8
2-4	24	22,6
5-9	2	1,9
10 ou mais	1	0,9
NI	4	3,8
Total	106	100

NI: Não informado.

Tabela 9 – Resultado quanto à localização das lesões, por paciente, em 106 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010

Localização das lesões	Nº	%
Cabeça e pescoço	23	21,7
Membros superiores	27	25,5
Membros inferiores	35	33,0
Tronco (tórax, costas, abdômen etc...)	7	6,6
Mais de um local	10	9,4
NI	4	3,8
Total	106	100

NI: Não informado.

Tabela 10 – Resultado quanto ao tempo da(s) lesão(ões) em 106 pacientes portadores de LTA atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010

Tempo da lesão	Nº	%
< 1 mês	3	2,8
1 – 3 meses	47	44,3
4 – 6 meses	23	21,7
7 – 12 meses	8	7,5
> 12 meses	12	11,3
NI	13	12,3
Total	106	100

NI: Não informado.

Tabela 11 – Resultado quanto ao tipo da(s) lesão(ões) em 106 pacientes portadores de LTA atendidos no Ambulatório do HUB, no período entre agosto de 2007 a julho de 2010

Tipo de lesão	Nº	%
Úlcera	73	68,9
Infiltração	9	8,5
Pápula	8	7,5
Verrucosidade	3	2,8
Associação de lesões	7	6,6
Outras (perfuração, cicatriz e eritema)	3	2,8
NI	3	2,8
Total	106	100

NI: Não informado.

4.4 – Exames de rotina para o diagnóstico da LTA

Os resultados e a sensibilidade de cada método de rotina para diagnóstico da LTA constam na Tabela 12. Em relação às técnicas parasitológicas, a pesquisa direta de amastigotas em lâmina demonstrou positividade em 50 (50,5%) e a cultura em 48 (49,5%) amostras. A IRM exibiu a maior sensibilidade, onde 90,7% dos pacientes mostraram reatividade acima das medidas 5 x 5 cm. A RIFI, outra técnica diagnóstica imunológica, obteve sensibilidade de 78,2%.

Tabela 12 – Resultados das sensibilidades dos testes para diagnóstico em amostras de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Hospital Universitário de Brasília, no período de agosto de 2007 a julho de 2010

RESULTADO	Cultura	Pesquisa direta	RIFI	IRM	Exame Histopatológico
Positivo (sensibilidade %)	48(49,5%)	50 (50,5%)	72 (78,2%)	78 (90,7%)	22 (22%)
Negativo	49	49	20	8	78

NR: exame não realizado. RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta. IRM: Intradermoreação de Montenegro.

4.5 – Sorologia para doença de Chagas em amostras de 102 pacientes portadores de LTA

Como relatado anteriormente, por motivos diversos, não foi possível obter soro de todos os pacientes. Desta forma, foram testadas alíquotas provenientes de 102 pacientes, uma vez que 4 pacientes foram excluídos da realização do ELISA exo-Ag por não terem sido obtidos os respectivos soros.

Os resultados estão dispostos na Tabela 13. As 4 amostras reativas nesta sorologia foram excluídas para o teste imunoenzimático proposto por não satisfazerem um dos critérios de inclusão.

Tabela 13 – Resultado da sorologia para doença de Chagas de 102 pacientes com diagnóstico de LTA, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010

Resultado	Nº	%
Reagente	4	3,9
Não reagente	98	96,1
Total	102	100

4.6 – ELISA exo-Ag em amostras de 98 pacientes portadores de LTA

Quando, enfim, todos os critérios de inclusão foram satisfeitos e o paciente teve confirmação de portador de LTA, foi realizado o teste de ELISA cujos antígenos empregados eram derivados de cultura de *L. mexicana* (Cellabs, Austrália). Os resultados das 98 amostras testadas estão relacionados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultado do ELISA utilizando exo-antígenos de *L. mexicana* em soros de 98 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010

Resultado	Nº	Sensibilidade % IC 95%
Reagente	89	90,8 ± 5,72
Não reagente	9	9,2
Total	98	100

4.7 Especificidades e acurácia do teste de ELISA exo-Ag

4.7.1 ELISA exo-Ag em amostras de 80 indivíduos aparentemente saudáveis e não portadores de LTA e os respectivos valores preditivos

A Tabela 15 apresenta os resultados referentes ao teste de ELISA com exo-Ag frente à amostras de soro de 80 pacientes aparentemente saudáveis e não portadores de LTA.

Tabela 15 – Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 80 pacientes aparentemente saudáveis e não portadores de LTA

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%)
Reagente	7	91,3 ± 6,2
Não reagente	73	
Total	80	

Com os resultados do desempenho do ELISA exo-Ag tanto com as amostras de pacientes portadores de LTA como as amostras de pacientes aparentemente saudáveis, foram obtidos os valores preditivos positivo e negativo. O valor preditivo positivo foi de 92,7% e o valor preditivo negativo foi de 89%.

4.7.2 ELISA exo-Ag em amostras de 24 pacientes portadores de doença de Chagas

Como resultado, obteve-se especificidade de 66,7 % para o ELISA exo-Ag, havendo reação acima do *cut-off* em 8 das 24 amostras (Tabela 16). O controle negativo apresentou absorvância abaixo do limite de positividade, validando a reação.

Tabela 16 – Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em amostras de 24 pacientes portadores de doença de Chagas, confirmada por critérios clínicos e por RIFI e PCR

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%)
Reagente	8	66,7 ± 18,8%
Não reagente	16	
Total	24	

4.7.3 ELISA exo-Ag em amostras de 33 pacientes portadores de doenças reumáticas

Foram obtidas 33 amostras e houve positividade do ELISA exo-Ag em 13, denotando especificidade geral de 42,4% (Tabela 17).

Tabela 17 – Resultados do teste de ELISA utilizando exo-Ag em amostras de 33 pacientes portadores de doenças reumáticas

Marcador reumático alterado	Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%)
ASO	Reagente	3	42,4 ± 16,9
	Não reagente	3	
PCR	Reagente	6	
	Não reagente	7	
FR	Reagente	4	
	Não reagente	4	
	Total	33	

ASO: antiestreptolisina O; PCR: proteína C reativa; FR: fator reumatóide.

4.7.4 ELISA exo-Ag em amostras 13 de pacientes portadores de pênfigo foliáceo sulamericano

A Tabela 18 reúne os resultados para teste de especificidade do ELISA exo-Ag testado com soros de 13 pacientes portadores de pênfigo foliáceo sulamericano. Inicialmente, os resultados do ELISA com exo-Ag foram tabulados considerando

aqueles tratados com corticóides quando da coleta do sangue e os não tratados. Porém, não houve diferença significativa entre os 2 grupos quanto aos resultados do teste de ELISA e os resultados passaram à compor a Tabela 18 de maneira unificada.

Tabela 18 – Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em amostras de pacientes portadores de pênfigo foliáceo sulamericano confirmado por critérios clínicos e por exame histopatológico

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%)
Reagente	3	76,9 ± 22,9
Não reagente	10	
Total	13	

4.7.5 ELISA exo-Ag em amostras de 8 pacientes portadores de hanseníase virchowiana

Os resultados desta fase estão expostos abaixo, na Tabela 19, onde se observou única amostra reativa. Cabe ressaltar que o número exíguo de amostras é creditado à menor casuística ocorrida durante os meses de acompanhamento junto ao Ambulatório de Dermatologia/HUB.

Tabela 19 – Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 8 pacientes portadores de hanseníase virchowiana confirmada por critérios clínicos e pela baciloscopia e exame histopatológico

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%)
Reagente	1	85,7 ± 24,2
Não reagente	7	
Total	8	

4.7.6 ELISA exo-Ag em amostras de 16 pacientes com reação VDRL positiva

Constam na Tabela 20 os resultados da reação de ELISA exo-Ag em soros de pacientes que apresentaram reação VDRL positiva na diluição mínima 1:8. Foram observadas 2 reações inespecíficas na totalidade de amostras testadas.

Tabela 20 – Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 16 pacientes com reação VDRL positiva

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%)
Reagente	2	87,5 ± 15,7
Não reagente	14	
Total	16	

4.7.7 ELISA exo-Ag em amostras de 9 pacientes portadores de micoses profundas

A Tabela 21 expõe os resultados da reação de ELISA exo-Ag em soros de pacientes portadores de micoses profundas. Quanto às micoses, foram incluídas amostras de pacientes em fase clínica, portadores de: esporotricose (n = 6), criptotocose (n = 1), cromomicose (n = 1) e paracoccidiodomicose (n = 1). Foram observadas 2 reações inespecíficas nas amostras testadas.

Tabela 21 – Resultado do teste de ELISA com exo-Ag em soros de 9 pacientes portadores de micoses profundas, confirmadas por critérios clínicos, exames histopatológico e laboratoriais

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%)
Reagente	2	77,8 ± 27,4
Não reagente	7	
Total	9	

O Gráfico 1 demonstra a reação de ELISA exo-Ag frente aos grupos de pacientes portadores de doenças diversas e também soros com reação positiva de VDRL, considerando a faixa de corte (“cut-off”) de 0,3 (absorbância) a fim de estabelecer positividade ou negatividade da amostra.

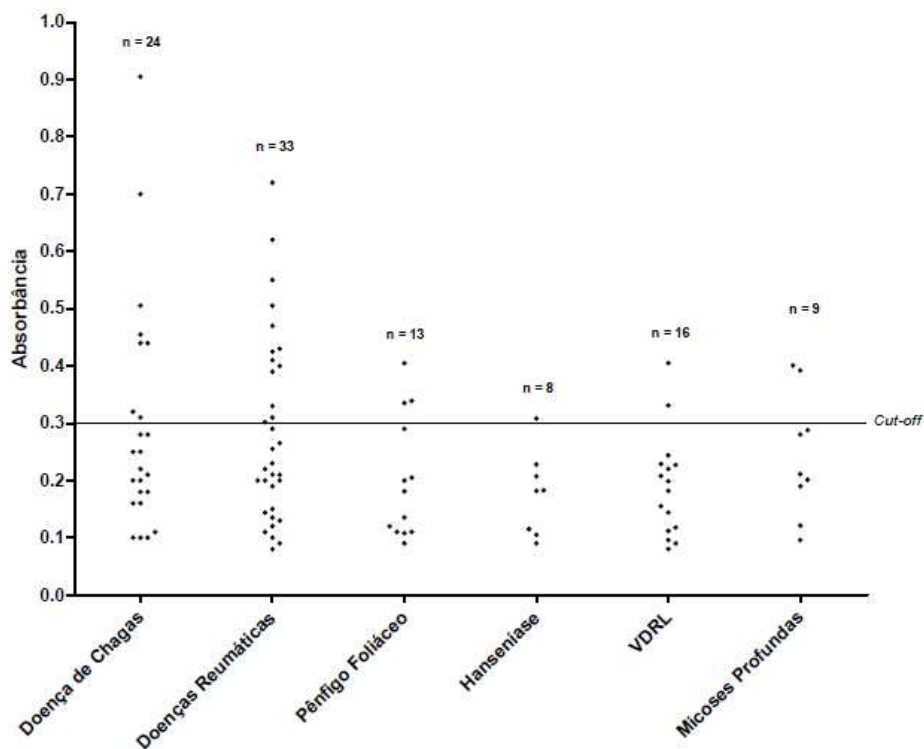


Gráfico 1 – Resultado da reação imunoenzimática empregando exo-antígenos de *L. mexicana* em soros de pacientes portadores de doenças diversas e de pacientes com reação de VDRL positiva.

4.7.8 Especificidade do teste de ELISA exo-Ag em grupo controle composto por indivíduos com outras doenças mais aqueles aparentemente saudáveis

Na Tabela 22 consta a especificidade geral da ELISA exo-Ag em um grupo-controle formado pela soma dos indivíduos portadores das doenças não LTA relatadas nos itens anteriores mais as amostras provenientes dos 80 pacientes aparentemente saudáveis.

Tabela 22 – Especificidade do teste de ELISA com exo-Ag em grupo-controle composto por 103 pacientes portadores de outras doenças mais 80 pacientes aparentemente saudáveis e não portadores de LTA

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%) IC 95%
Reagente	36	80,3 ± 5,7
Não reagente	147	
Total	183	

IC: intervalo de confiança

Após calcular a especificidade deste grupo para o teste de ELISA exo-Ag, foram obtidos os valores preditivos positivo e negativo levando-se ainda em consideração os resultados para sensibilidade deste método. O valor preditivo positivo foi de $73,5 \pm 8,8\%$ ($n = 96$) enquanto que o valor preditivo negativo calculado foi de $93,3\% \pm 5,4$ ($n = 81$).

4.7.9 Acurácia do teste de ELISA exo-Ag

Após a consecução dos testes de ELISA utilizando exo-Ag em soros de pacientes portadores de LTA e em soros de indivíduos aparentemente saudáveis, a acurácia do teste foi calculada, sendo encontrado o valor de 87,6%.

4.8 – IFD em lâminas com *imprints* de fragmento de lesão cutânea provenientes de 72 pacientes portadores de LTA

Na Tabela 23 estão os resultados da IFD realizada em lâminas dos 72 pacientes incluídos, onde a positividade do método proposto ocorreu em 52 (72,2%) amostras. Deve-se ressaltar que, quando houve positividade do presente método proposto em uma lâmina de determinado paciente, também houve achado de fluorescência na segunda lâmina do mesmo paciente, na maioria dos casos positivos (48 de 52).

Tabela 23 – Resultado da IFD em *imprints* de fragmentos de lesão cutânea em lâmina, provenientes de 72 pacientes portadores de LTA, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010

Resultado	Nº	Sensibilidade % IC 95%
Positivo	52	$72,2 \pm 10,4$
Negativo	20	27,8
Total	72	100

IC: intervalo de confiança

4.9 Especificidade e valores preditivos do teste da IFD

As lâminas de pacientes cuja hipótese diagnóstica de LTA foi descartada em função dos dados clínicos e/ou epidemiológicos e/ou laboratoriais, foram testadas pela metodologia da IFD. A Tabela 24 expõe os resultados obtidos nesta etapa.

Tabela 24 – Resultado do teste de IFD em lâminas com *imprint* de fragmento de lesão cutânea de 55 pacientes não portadores de LTA de acordo com critérios clínicos, epidemiológicos e/ou laboratoriais

Resultado	Nº de amostras	Especificidade (%) IC 95%
Reagente	2	96,3 ± 5,0
Não reagente	53	
Total	55	

IC: intervalo de confiança

Diante dos resultados tanto da sensibilidade quanto da especificidade, foram calculados os valores preditivos positivo e negativo para os testes de IFD. O valor preditivo positivo foi de 96,3% ± 4,3 (n=79), ao passo que o valor preditivo negativo foi de 72,6 ± 10,1(n=75) %.

4.10 Acurácia do teste de IFD

Após a consecução dos testes de IFD em lâminas com *imprint* de fragmento de lesão cutânea dos pacientes portadores e dos não portadores de LTA, a acurácia do teste foi calculada, sendo encontrado o valor de 82,7%.

4.11 Sensibilidade conjunta dos métodos propostos

A Tabela 25 demonstra a análise dos resultados dos testes propostos naqueles pacientes em que o ELISA exo-Ag e a IFD foram realizados.

Tabela 25 – Número de testes de ELISA exo-Ag e de IFD positivos e negativos em 64 portadores de LTA, atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB no período de agosto de 2007 a julho de 2010

Doentes (n = 64)	Ambos Negativos	ELISA exo-Ag positivo apenas	IFD positivo apenas	Ambos positivos
	03	15	02	44
Total	03	17		44

4.12 – PCR-RFLP a partir de papel de filtro com *imprints* de fragmento de lesão cutânea proveniente de 64 pacientes portadores de LTA

Conforme protocolo descrito neste trabalho, 64 amostras foram testadas pela PCR. Os resultados estão evidenciados nas Figuras 8, 9 e 10. As amostras consideradas negativas nas primeiras reações, foram inseridas em nova PCR, porém, com volumes acrescidos de 7 microlitros do extraído (Figura 11) ao invés de apenas 5 microlitros, por orientação da Profa. Dra. Ana Roselino (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP).

As amostras positivas nas PCR's foram submetidas à digestão enzimática pela *HAE* III e os *amplicons* digeridos (ou não) foram aplicados em gel de poliacrilamida para visualização (Figuras 12, 13 e 14) a fim de caracterizar o subgênero (*Leishmania* ou *Viannia*) conforme padrão de digestão e migração no gel.

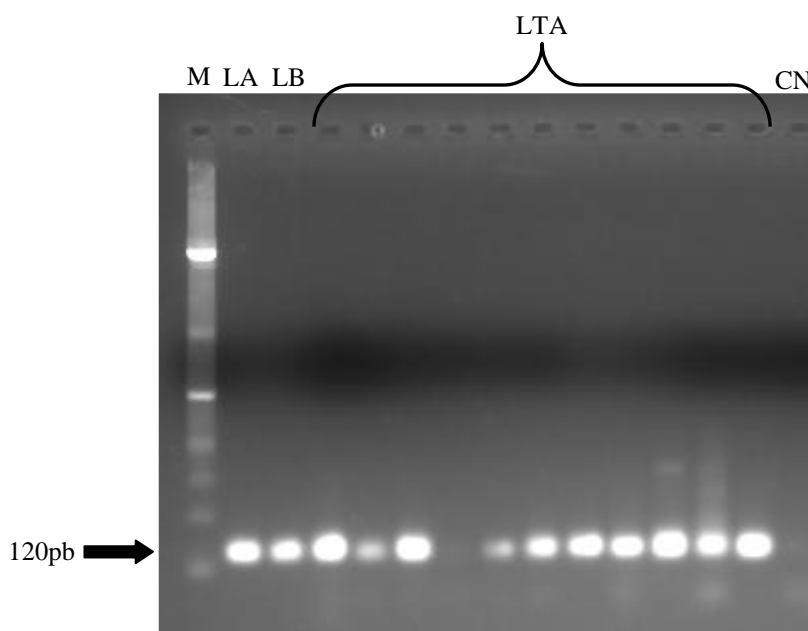


Figura 8 – Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de *Leishmania sp* a partir de extraído de papel de filtro impregnado com tecido de lesão cutânea de pacientes portadores de LTA. Linhas: M, marcador de peso molecular 100pb; LA, controle positivo (*L. amazonensis*); LB, controle positivo (*L. braziliensis*); Amostras de pacientes portadores de LTA (chave): pacientes 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 17; CN, controle negativo.

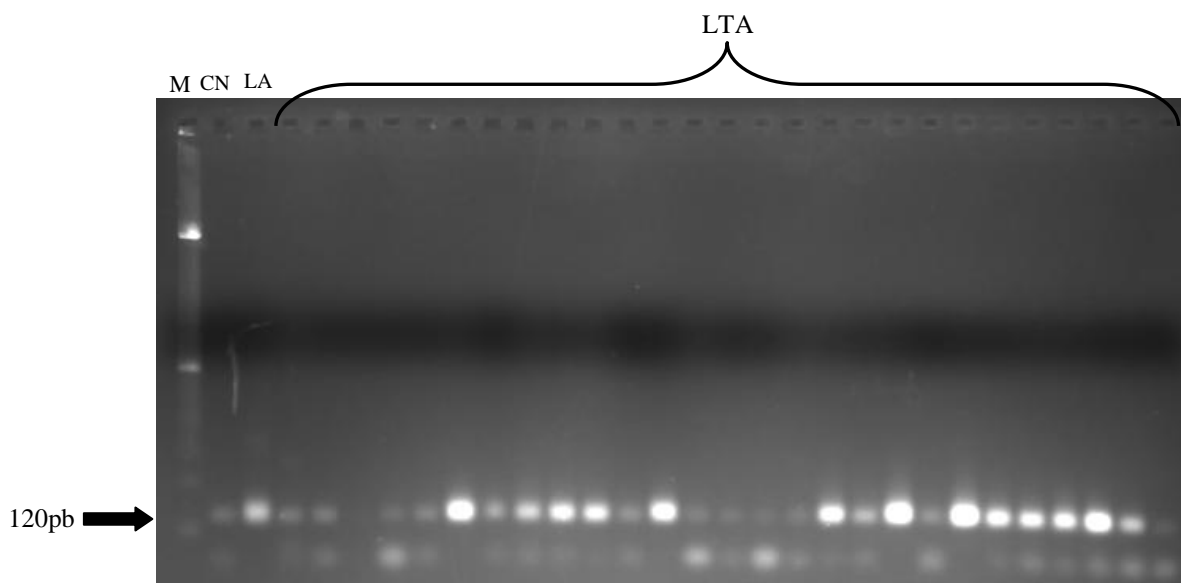


Figura 9 – Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de *Leishmania sp* a partir de extraído de papel de filtro impregnado com tecido de lesão cutânea de pacientes portadores de LTA. Linhas: M, marcador de peso molecular 100pb; CN, controle negativo; LA, controle positivo (*L. amazonensis*); Amostras de pacientes portadores de LTA (chave): pacientes 1, 2, 11, 16, 18, 19, 20, 22, 25, 26, 28, 31, 33, 34, 35, 36, 41, 42, 45, 46, 47, 48, 52, 55, 56, 58 e 62.

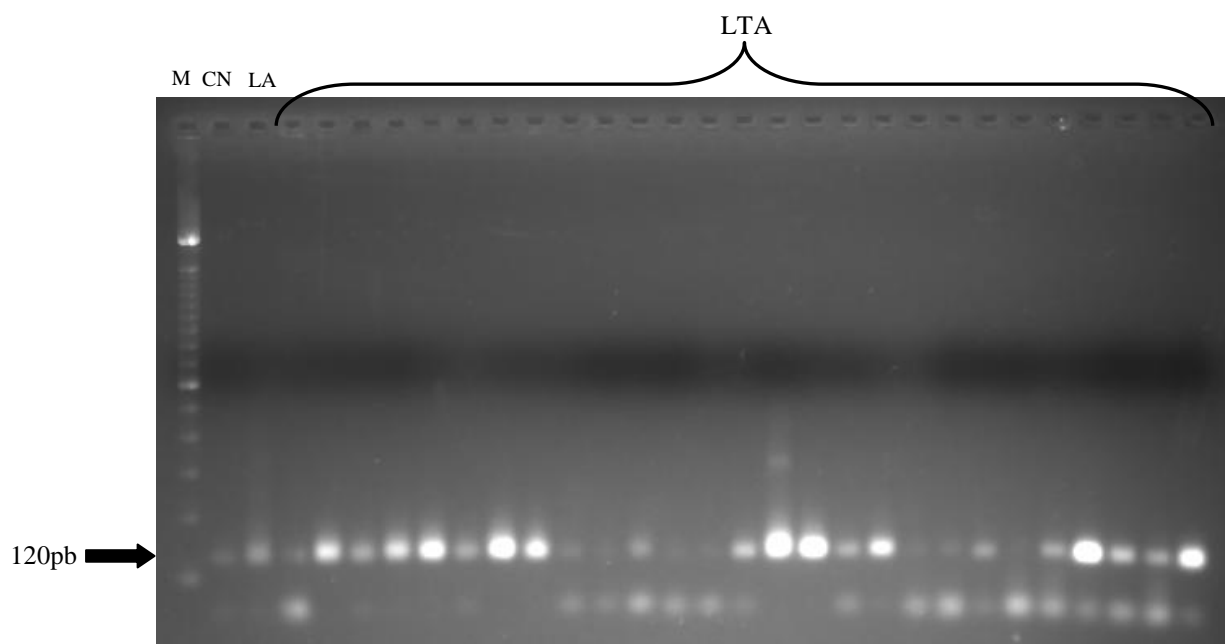


Figura 10 – Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de *Leishmania sp* a partir de extraído de papel de filtro impregnado com tecido de lesão cutânea de pacientes portadores de LTA. Linhas: M, marcador de peso molecular 100pb; CN, controle negativo; LB, controle positivo (*L. amazonensis*); Amostras de pacientes portadores de LTA (chave): pacientes 63, 64, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 77, 79, 80, 81, 83, 84, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 102, 104, 105 e 106.

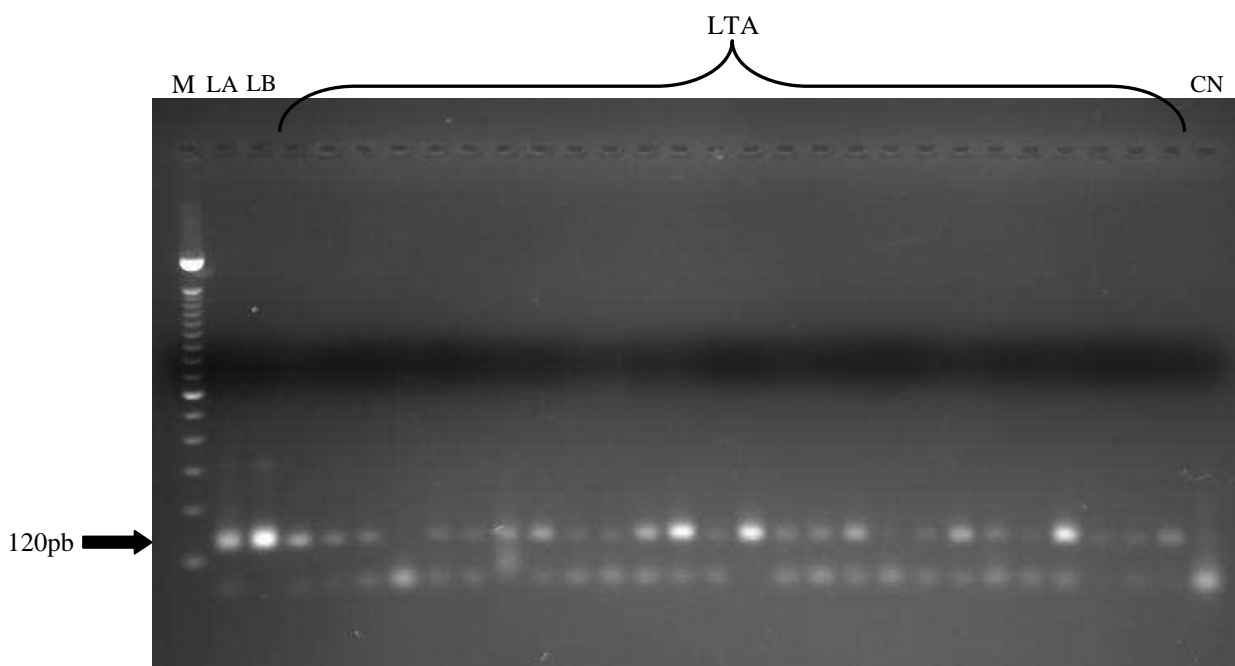


Figura 11 – Gel de agarose a 2% com produtos de PCR após amplificação de trecho de DNA de *Leishmania sp* a partir de extraído (em volume de 7 μ L) de papel de filtro impregnado com tecido de lesão cutânea de pacientes portadores de LTA. Linhas: M, marcador de peso molecular 100pb; LA, controle positivo (*L. amazonensis*); LB, controle positivo (*L. braziliensis*); Amostras de pacientes portadores de LTA (chave): pacientes 1, 2, 11, 16, 18, 28, 33, 34, 35, 36, 42, 46, 57, 62, 63, 70, 73, 74, 77, 79, 80, 93, 95, 98, 99 e 100; CN, controle negativo.

Após visualização das Figuras 8, 9, 10 e 11, as amostras consideradas positivas foram submetidas à RFLP, por ação da enzima *HAE III*. Ao todo, 47 amostras revelaram positividade pela PCR. As Figuras 12, 13 e 14 retratam as digestões pela endonuclease de restrição.

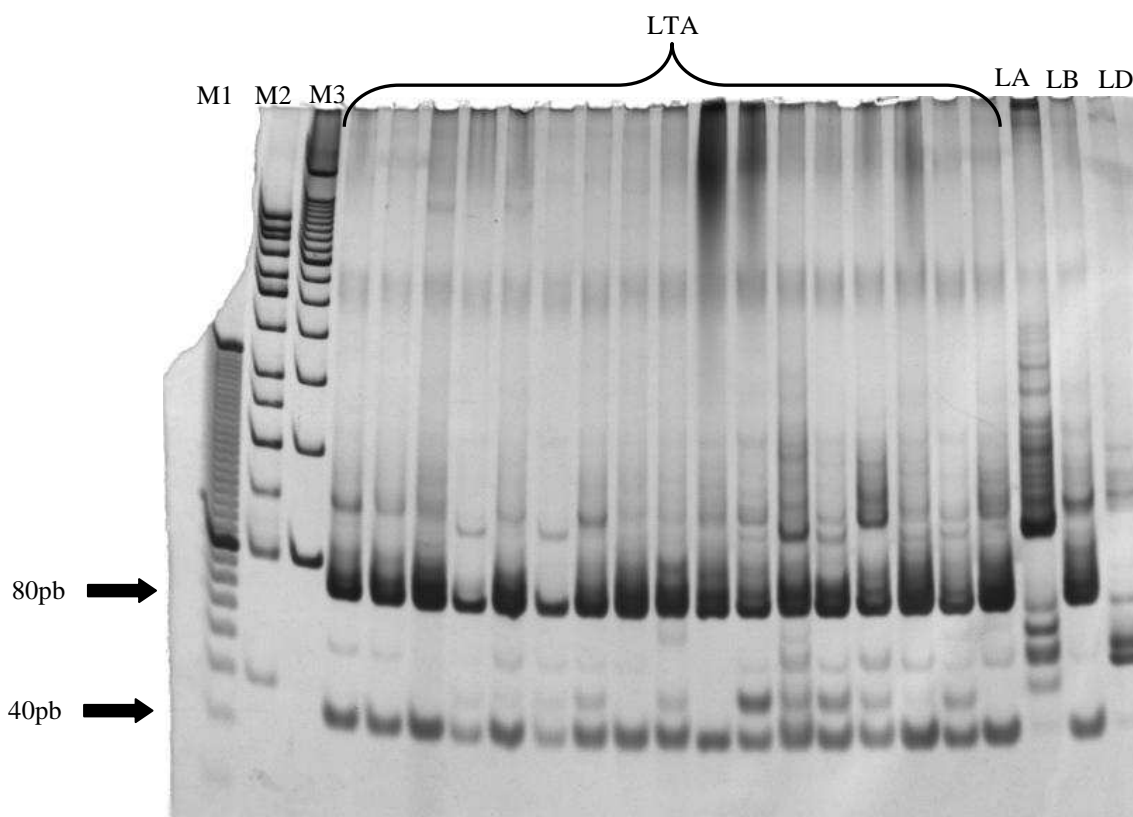


Figura 12 – Gel de poliacrilamida a 10% com produtos de PCR após digestão pela enzima *HAE III*. Linhas: M1, marcador de peso molecular 10pb; M2, marcador de peso molecular 50 pb; M3, marcador de peso molecular 100 pb; LTA (chave): produtos de PCR obtido a partir de extraídos de papel de filtro com *imprint* de lesão cutânea proveniente de pacientes portadores de LTA: pacientes 4, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 22, 25, 26, 31, 41 e 45; LA, cepa de referência de *L. amazonensis* MHOM/BR/PH8; LB, cepa de referência de *L. braziliensis* MHOM/BR/94/M15176; LD, cepa de referência de *L. donovani*.

A Figura 12 mostra que todos os pacientes apresentaram *amplicons* digeridos pela *HAE III*, evidenciando 2 bandas, uma de 80 e outra de 40pb. Assim, pode-se afirmar que trata-se de *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Em contraste, nota-se que o material genético amplificado a partir de cepa de *L. amazonensis* e de *L. donovani*, usados como controle, não apresentou digestão, validando a reação.

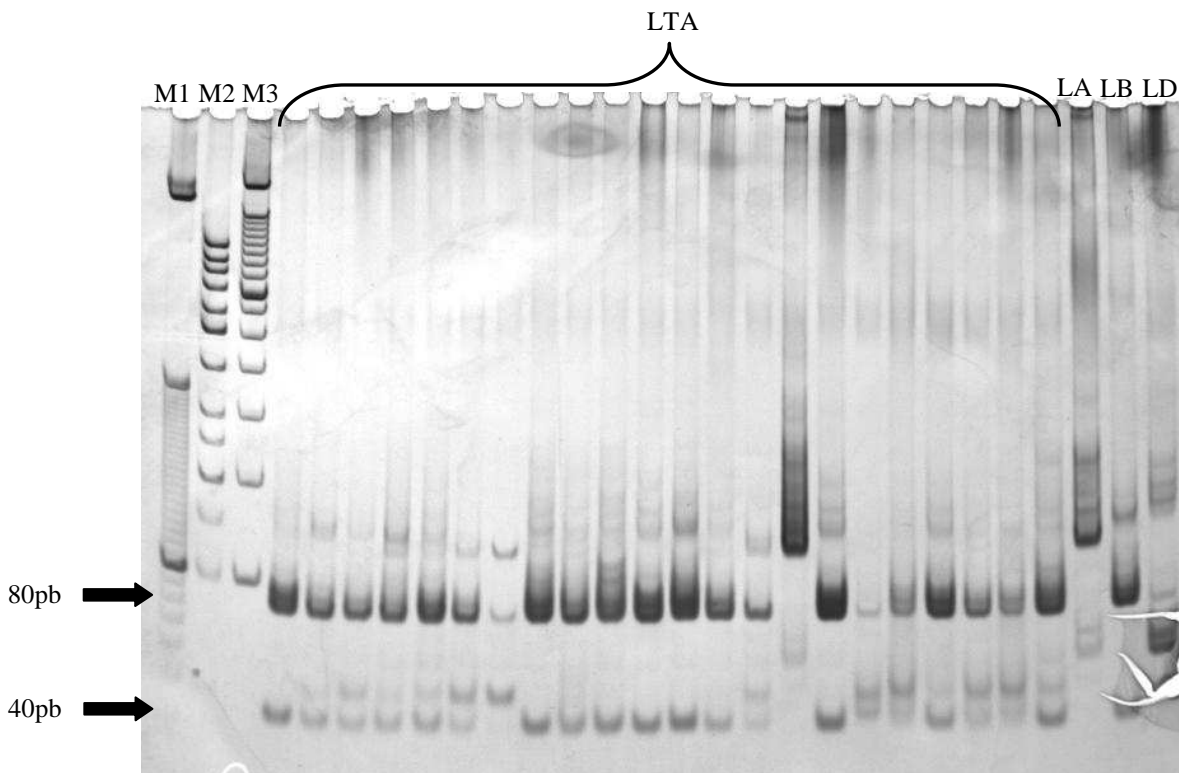


Figura 13 – Gel de poliacrilamida a 10% com produtos de PCR após digestão pela enzima *HAE III*. Linhas: M1, marcador de peso molecular 10pb; M2, marcador de peso molecular 50 pb; M3, marcador de peso molecular 100 pb; LTA (chave): produtos de PCR obtido a partir de extraídos de papel de filtro com *imprint* de lesão cutânea proveniente de pacientes portadores de LTA: pacientes 47, 48, 52, 55, 56, 58, 62, 64, 67, 68, 69, 71, 72, 81, 83, 84, 95, 101, 102, 104, 105 e 106; LA, cepa de referência de *L. amazonensis* MHOM/BR/PH8; LB, cepa de referência de *L. braziliensis* MHOM/BR/94/M15176; LD, cepa de referência de *L. donovani*.

A análise da Figura 13 revela que 19 das amostras amplificadas foram digeridas pela *HAE III*, formando 2 bandas, uma de 80 e outra de 40pb, fato específico do subgênero *Viannia*. Por outro lado, 1 amostra (número 83) não revelou o mesmo padrão de digestão, o que permite classificá-las como do subgênero *Leishmania*. Há 2 amostras (62 e 81) cujo padrão das bandas eletroforéticas não permite classificá-las quanto ao subgênero, necessitando de repetir ou ainda realizar digestão com outra enzima. Os controles amplificadas a partir de cepa de *L. amazonensis* e de *L. donovani* não apresentaram digestão, validando a reação.

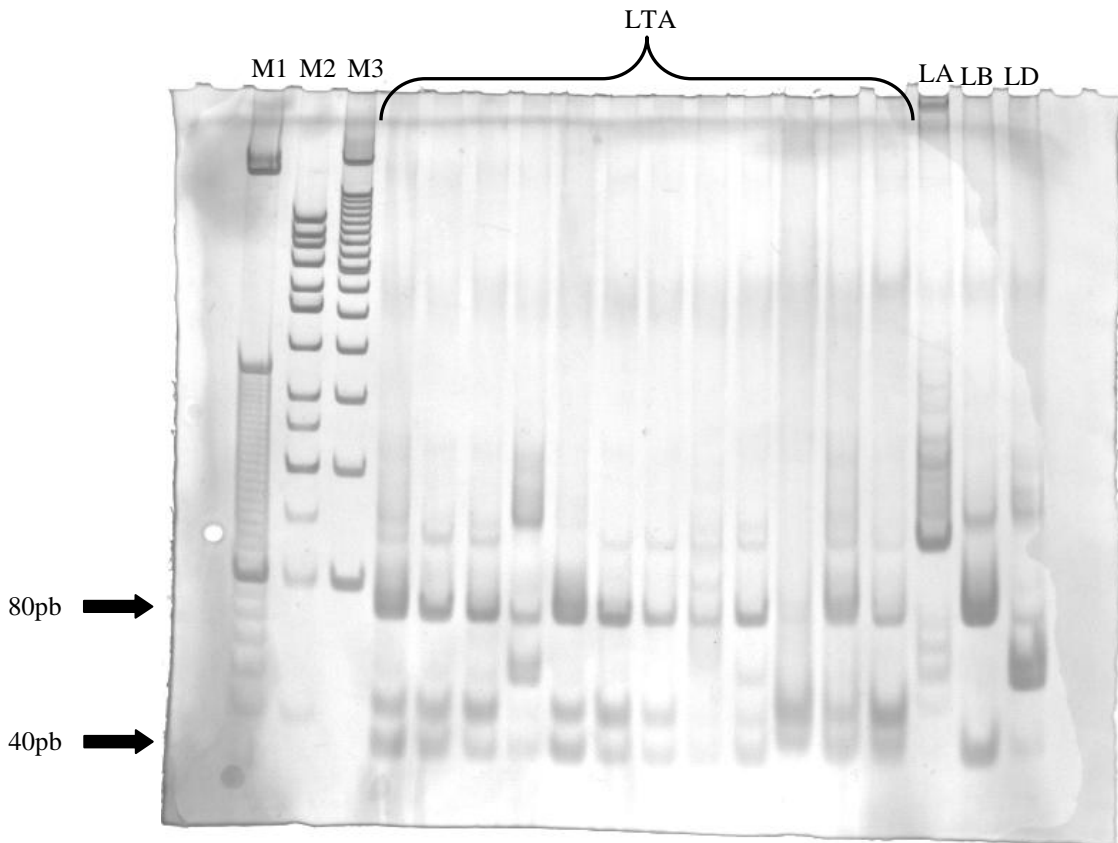


Figura 14 – Gel de poliacrilamida a 10% com produtos de PCR após digestão pela enzima *HAE III*. Linhas: M1, marcador de peso molecular 10pb; M2, marcador de peso molecular 50 pb; M3, marcador de peso molecular 100 pb; LTA (chave): produtos de PCR obtidos a partir de amostras extraídas de papel de filtro com *imprint* de lesão cutânea proveniente de pacientes portadores de LTA: pacientes 16, 33, 36, 57, 63, 70, 77, 79, 100, 110, 111 e 112 (os 3 últimos não estão incluídos neste trabalho); LA, cepa de referência de *L. amazonensis* MHOM/BR/PH8; LB, cepa de referência de *L. braziliensis* MHOM/BR/94/M15176; LD, cepa de referência de *L. donovani*.

A Figura 14 refere-se às últimas amostras positivas na PCR, cujos respectivos produtos de amplificação foram submetidos à ação da *HAE III*. Observa-se digestão e produção de 2 bandas (80 e 40 pb) em 8 amostras, característica de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, ao passo que 1 (paciente 57) não apresentou o mesmo padrão de digestão. Porém, a existência de três bandas na amostra deste paciente pode indicar, provavelmente, um caso de infecção por *Leishmania donovani chagasi*.

Por fim, as amostras positivas para PCR, após digestão com enzima de restrição e qualificadas quanto ao subgênero, foram contabilizadas em números absolutos e relativos (Tabela 26).

Tabela 26 – Resultados da caracterização dos subgêneros de *Leishmania sp* por meio da técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima *HAE III* em amostras de papel de filtro com *imprint* de lesão cutânea de 47 pacientes portadores de LTA atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB, entre agosto de 2007 e julho de 2010

Subgêneros	Número de casos	%
<i>Leishmania Viannia</i>	43	91,5
<i>Leishmania Leishmania</i>	01	2,1
<i>Leishmania donovani chagasi</i> *	01	2,1
Não classificado	02	4,2
Total	47	100

* Suspeita. Necessita confirmação.

O portador de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* (de acordo com o diagnóstico molecular executado) relatou como local de provável infecção o município de Luziânia/GO. Os 2 pacientes portadores das espécies cuja identificação foi inconclusiva relataram como local de provável contágio a região administrativa do Gama/DF e o município de Padre Bernardo/GO. O paciente cuja amostra demonstra possível infecção por *L. donovani chagasi* relatou local de provável infecção o município de Padre Bernardo/GO.

4.13 Análise do resultado da PCR-RFLP em função das formas clínicas da LTA

As formas cutânea e mucosa foram relacionadas com a identificação do subgênero (Tabela 27).

Tabela 27 – Resultado da PCR-RFLP frente às formas clínicas da LTA em 47 pacientes portadores atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010

Formas clínicas	<i>Leishmania Viannia</i>	<i>Leishmania Leishmania</i>	<i>Leishmania donovani chagasi</i> *	Não classificado *
Cutânea	39	01	01	01
Mucosa	4	0	0	01
Total	43	01	01	02

4.14 Análise dos resultados dos testes propostos em relação à parâmetros clínicos e laboratoriais

A Tabela 28 relaciona os resultados dos testes de ELISA exo-Ag e da IFD, discriminando-os em relação aos parâmetros clínicos da LTA e a Tabela 29 busca a relação entre os resultados dos 2 testes propostos e os testes de rotina.

Tabela 28 – Resultados dos testes de ELISA exo-Ag e da IFD em relação à parâmetros clínicos e laboratoriais de pacientes portadores de LTA atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010

Agrupamentos	ELISA exo-Ag		IFD	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Número de pacientes	89	9	52	20
Forma				
Cutânea	76	06	48	17
Mucosa	13	03	04	03
Número de lesões				
01	62	07	37	15
02-04	21	02	12	03
05-09	03	0	02	01
NI	03	0	01	01
Tempo de lesão				
< 1mês	03	0	02	0
1-3 meses	38	07	23	08
4-6 meses	17	0	15	04
7-12 meses	08	0	03	01
> 12 meses	11	1	04	05
NI	12	0	05	02
Recidiva				
Sim	11	0	02	03
Não	75	08	47	17
NI	03	01	03	0
Subgênero de <i>Leishmania</i> (PCR-RFLP)	Em 52 pacientes		Em 39 pacientes	Em 16 pacientes
<i>L. (Viannia)</i>	38	04	26	09
<i>L. (Leishmania)</i>	0	01	01	0
<i>L. donovani chagasi</i> *	0	01	0	01
Não classificado*	02	03	01	01
Negativa	12	0	11	05

Legenda: NI – Não informado.

Tabela 29 - Resultados dos testes de ELISA exo-Ag e da IFD em relação aos testes de laboratoriais de rotina de pacientes portadores de LTA atendidos no HUB, no período de agosto de 2007 a julho de 2010

Agrupamentos	ELISA exo-Ag		IFD	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Número de pacientes	89	9	52	20
Exames de rotina				
Cultura				
Positiva	41	04	27	07
Negativa	41	04	25	13
NR	07	01	0	0
Pesquisa direta				
Positiva	40	05	29	07
Negativa	43	03	23	13
NR	06	01	0	0
RIFI				
Positiva	65	04	32	17
Negativa	19	04	15	03
NR	05	01	05	0
IRM				
Positiva	65	07	40	18
Negativa	08	01	04	01
NR	16	01	08	01
Histopatológico				
Positiva	17	02	15	03
Negativa	68	05	36	16
NR	04	02	01	01

Legenda: NR – Não realizado.

4.15 – Mensuração dos custos de cada técnica de diagnóstico

Este trabalho avaliou o custo de cada técnica com o objetivo de permitir comparações entre a ELISA exo-Ag, a IFD e as técnicas realizadas para o diagnóstico de rotina para LTA.

O kit de ELISA exo-Ag, no formato de venda direta, modalidade normalmente realizada por universidades públicas, custa, em dólares americanos, 1.137,00 US\$, conforme valores repassados pelo representante da empresa Cellabs no Brasil. Considerando cotação do dólar comercial do dia 21/08/2011 de 1,6034 R\$, o kit para 96 testes custa 1.824,00 R\$. Testes sorológicos imunoenzimáticos são realizados em duplicata, além disso, a cada teste (ou a cada placa de ELISA) deve-se incluir um controle positivo e um controle negativo. Desta forma, a placa de ELISA teve 2 poços reservados para o controle positivo, mais 2 para o controle negativo. Sobraram 92 poços

para testes em soros, sendo 2 para cada amostra. Portanto, ao final, cada placa de ELISA possibilita o emprego de 46 amostras. Ao se dividir o preço do kit de 1.824,00 R\$ por 46 (amostras ou pacientes), chega-se ao valor de 39,65 R\$ por teste.

Da mesma forma, após pesquisa junto ao representante da Cellabs no Brasil, o kit de IFD, considerando também a forma de venda direta, custa em dólares americanos 966,70 US\$, que, ao ser convertido para a moeda nacional brasileira pela mesma cotação de 1,6034 R\$ do dólar comercial, tem-se o valor de 1.550,00 R\$ para cada kit de 50 testes. Dividindo-se o montante do kit pelo número 50 de testes, o valor de cada um é de 31,00 R\$.

O custo total das técnicas de rotina foi de 57,09 R\$, ao passo que as técnicas propostas apresentaram o valor de 70,65 R\$ por paciente (Tabela 30).

Tabela 30 – Custo aproximado por teste, em reais, de cada técnica utilizada para o diagnóstico da LTA, do ELISA exo-Ag e da Imunofluorescência Direta

TÉCNICA	Cultura	Pesquisa direta	RIFI	IRM	Exame Histopatológico	ELISA exo-Ag	IFD
Custo por teste (R\$)	0,65	0,43	0,71	5,30	50,00	39,65	31,00
TOTAL (R\$)				57,09		70,65	

RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta. IRM: Intradermoreação de Montenegro. ELISA exo-Ag: ensaio imunoenzimático com exo-antígenos de promastigotas de *L. mexicana*. IFD: Imunofluorescência Direta.

A IFD teve seu custo mensurado em função do preço para aquisição, além do gasto com o reagente para fixação (acetona) e a lâmina usada para impregnar a amostra. No caso do ELISA exo-Ag, cada teste foi precificado com base no custo de aquisição do kit.

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Antes de discutir os resultados, vale ressaltar que a falta de amostras, em muitos dos casos, ocorreu devido à sobreposição de procedimentos em diferentes pacientes no Ambulatório de Dermatologia/HUB. Neste caso, optou-se pelo seguimento completo de um paciente em detrimento de outro. Houve casos, em menor número, nos quais a biópsia ocorria em outro dia por conta de infecção secundária no sítio da lesão. Outros pacientes, por sua vez, foram biopsiados no Ambulatório de Otorrinolaringologia do mesmo nosocômio pelo fato da lesão envolver mucosas, o que tornava inviável o acompanhamento de tal procedimento naquele setor de forma simultânea. Por fim, houve casos de pacientes que se apresentavam com laudos de biópsia em mãos, realizada em outro laboratório, por meios próprios.

Nota-se claro aumento na casuística ao longo do intervalo de tempo. Inclusive, o maior número de pacientes com diagnóstico confirmado para LTA se deu no último ano, mesmo a inclusão sendo realizada somente até o mês de julho. Contudo, a tendência ao aumento de casos não reflete os dados do SINAN (DATASUS, 2010), quando comparados os anos 2008, 2009 e 2010. O ano de 2007 não permite comparações, pois a confirmação de casos para este trabalho iniciou no oitavo mês do ano. Em relação aos demais anos, teoriza-se a possibilidade de sub-notificação dos casos de LTA no DF uma vez que o número de casos pelo SINAN foi menor do que os casos clínicos incluídos no presente estudo.

A predominância de pacientes do sexo masculino aliado à maior incidência de casos nas faixas etárias dos 21 aos 30 anos parecem indicar estreita relação da LTA com o período de maior atividade de trabalho com a LTA. O constatado é importante do ponto de vista sócio-econômico, uma vez que atinge indivíduos na fase mais produtiva da vida, reiterando o encontrado em outros estudos (SAMPAIO & DE PAULA, 1999; NAME *et al.*, 2005).

A transmissão peridomiciliar é reforçada naqueles casos de LTA em crianças, grupo de pacientes cuja doença não costuma possuir associação com atividade de trabalho e nos quais há o fator dependência para locomoção, sobretudo para aqueles de idade mais tenra.

Diante do exposto na Tabela 3, foi observado predomínio de casos relacionados à atividade no campo, conforme verificado em outros trabalhos. Por outro lado, tal fato não implica diretamente em atividade laboral, uma vez que em alguns prontuários pesquisados o motivo da exposição do paciente ao ambiente rural se dava por fator recreativo.

Apesar da maioria (69,8%) dos pacientes ter declarado como endereço de residência o Distrito Federal, um dado importante coletado foi o Estado de Goiás como o local de mais relatado como de provável contágio, conforme relato do paciente ao clínico (Tabela 5).

Aprofundando um pouco mais, observou-se que dos 30 casos com provável contágio em Goiás, 21 ocorreram em municípios da Região do Entorno de Brasília. Esta área sofre forte influência da capital federal por fatores econômicos, além da proximidade geográfica, que torna ainda mais intensa a mobilidade de pessoas entre o DF e aquela região. Inclusive, credita-se este motivo como causa da procura do HUB pelos pacientes, unidade de referência em no diagnóstico e tratamento da leishmaniose.

A região norte do DF é aquela que apresentou a maioria dos casos prováveis de infecção, com destaque para as regiões administrativas de Brazlândia, Sobradinho I, Sobradinho II e Planaltina. Este fato corrobora outra observação semelhante: a de maior número de prováveis casos ocorridos na região norte do Entorno, principalmente em cidades goianas que fazem divisa com o DF, tais como Padre Bernardo, Planaltina e Formosa, localizadas também ao norte do DF.

A LTA, de acordo com a OMS, está no grupo das doenças consideradas negligenciadas, isto é, acomete, de maneira predominante, pacientes de faixa de renda inferior e os investimentos em diagnóstico e tratamento não se mostram financeiramente viáveis para a indústria. Como agravante, há também a complexidade da relação parasito-hospedeiro, compreendida apenas parcialmente, com diferentes padrões de resposta celular e humoral.

O Ministério da Saúde, por meio da Secretaria de Vigilância em Saúde, recomenda os métodos de demonstração do parasito como forma de atingir o diagnóstico de certeza, com preferência para a pesquisa direta em lâmina, a cultura e o

exame histopatológico. De forma complementar, dada a sensibilidade mediana destes métodos, técnicas imunológicas, como ELISA, a RIFI e a IRM devem ser empregadas.

Neste cenário complexo de diagnóstico, onde nem sempre sensibilidade e especificidade relacionam-se de forma satisfatória, novos métodos buscam agregar parâmetros ideais ao diagnóstico da LTA.

Em relação aos métodos de diagnóstico, o primeiro a ter seus resultados aqui discutidos é a cultura. Neste trabalho, foram empregados 2 tubos por pacientes, os quais renderam positividade de 49,5% das amostras testadas (Tabela 12). Tal fato deve ser ressaltado, visto que em alguns trabalhos, valores semelhantes de sensibilidade somente foram alcançados com a utilização de quantidade maior de tubos com meio de cultura por paciente (NAVIN, 1990; WEIGLE, 1993). Provavelmente, credita-se o bom resultado ao fato de se tratar de um laboratório especializado e com técnicos com vários anos de experiência na rotina diagnóstica para leishmaniose. Contudo, há resultados de trabalhos mais recentes, cujos autores observaram sensibilidades maiores quando empregaram a cultura de aspirado de lesão (CHOUHI et al., 2009 e LUZ et al., 2009), demonstrando a importância de fatores cruciais como o meio de cultura utilizado e a técnica correta no momento da coleta.

A obtenção das formas promastigotas depende do sucesso na diferenciação da forma amastigota para promastigota em meio de cultura. Neste ponto, encontramos controvérsias sobre o melhor meio a ser empregado, o tipo de material (fragmento ou aspirado), o número de tubos de cultura ideal, a influência dos antissépticos empregados na assepsia e a destreza daquele que realiza a coleta da amostra no sítio de infecção.

Uma provável medida para aumento da sensibilidade da cultura é a adoção de outro meio bifásico, o coração-cérebro-sangue (CCS), mais rico em nutrientes que o NNN e com comprovada propriedade de proporcionar maior taxa de multiplicação de formas promastigotas de *Leishmania* (SZARGIKI, 2005).

Outra opção é meio de cultura contendo ágar sangue base e 15% de sangue desfibrinado, uma espécie de NNN modificado, demonstrou rápido crescimento de leishmanias do complexo *braziliensis*, espécies normalmente mais fastidiosas, aumentando a capacidade de cultivo destes parasitos (WALTON, SHAW e LAINSON, 1977).

A pesquisa direta de parasitos em lâmina com material impregnado a partir de fragmento de pele com lesão ativa e corado pelos métodos de Giemsa, Wright, ou Leishman, apresenta maior positividade quanto mais recentes forem as lesões.

Neste trabalho, a sensibilidade da pesquisa direta foi de 50,5%. Este resultado encontra-se em posição mediana quando comparado a outros, cujos índices de positividade do esfregaço em lesões causadas por *L.(V.) braziliensis* mostraram notável variação, indo de 14 a 89%, conforme trabalhos de outros pesquisadores (CUBA et al., 1980; CUBA et al., 1981; NAVIN, 1990; WEIGLE, 1993; RODRIGUES et al., 2002; SAMPAIO et al., 2002; PERLES et al., 2006; MENEZES DA SILVA et al., 2007; REIS et al., 2008; LUZ et al., 2009).

Os pontos críticos desta técnica envolvem a correta confecção da lâmina e a observação ao microscópio, exigindo um técnico bem treinado, sobretudo quando a *L.(V.) braziliensis* é a espécie pesquisada, pelo seu diminuto tamanho, com escassez em lesões com mais de 3 meses.

As técnicas parasitológicas discutidas até este ponto demonstraram sensibilidades semelhantes, havendo estreita correlação entre a pesquisa em lâmina e a cultura, visto que na maioria dos casos, quando uma técnica era positiva, a outra também demonstrava positividade.

Apesar de não ser realizada de forma rotineira, a inoculação em animais não deve ser totalmente desconsiderada. Assim, formas promastigotas também podem ser resgatadas de cultura de lesões de animais previamente inoculados com material de lesão de leishmaniose.

A inoculação em hamster é uma técnica dispendiosa e demorada para se obter resultados. No entanto, pode ser a mais eficaz quando os animais são acompanhados com muita atenção e cuidados (CUBA et al., 1984). Os melhores resultados são referidos por WEIGLE, 1993, com 56,7% de positividade. NAVIN, 1990, realizou inoculação em hamster com aspirado de lesão, ao invés do fragmento como WEIGLE, 1993, e encontrou 41,3%.

A IRM obteve o maior valor de sensibilidade dentre os métodos rotineiros de diagnóstico da LTA. É uma metodologia baseada na capacidade do sistema imunológico

atuar de maneira tardia ao ser exposto à presença de antígeno. Este último, por sua vez, é produzido de forma artificial, o que implica em diferenças existentes quando comparados antígenos de diferentes fabricantes, fato atestado por SILVA *et al.*, 2004.

No presente trabalho, foram observados 78 casos de IRM positiva, o que em números relativos revela sensibilidade de 90,7%, a mais alta dentre todas as técnicas de rotina para diagnóstico laboratorial da LTA. Este achado é ainda mais curioso quando, ao atentar-se para a Tabela 10, nota-se que praticamente a metade dos pacientes relatou possuir lesão há, no máximo, 3 meses. O fato vai de encontro ao conhecimento prático de que a IRM apresenta baixa eficiência quando as lesões cutâneas tem menos de 4 meses.

Os valores da sensibilidade da IRM revelaram-se os maiores até mesmo quando comparados com outros trabalhos que obtiveram bons resultados para esta técnica (FERREIRA *et al.*, 2006; LUZ *et al.*, 2009). No entanto, ao lembrar que MENEZES DA SILVA *et al.*, 2007, observaram apenas 30% de positividade para IRM, deve-se dar crédito à possível variação do antígeno utilizado, além do local de realização do teste, como ocorre no DF e Goiás, locais de crescente endemicidade da doença. Provavelmente este foi o fator determinante para os elevados índices de positividade da IRM.

A RIFI mostrou percentuais de sensibilidade na média dos métodos propostos, onde houve positividade em 63 amostras (72,7%), graças à sua característica de detecção de anticorpos, ainda que em baixas concentrações. Tal achado é semelhante àqueles encontrados em alguns trabalhos realizados no Brasil, em regiões endêmicas para a LTA, nos quais a pesquisa de anticorpos no soro dos pacientes demonstra maior sensibilidade (GARCIA *et al.*, 2005; FERNANDES *et al.*, 2006; PERLES *et al.*, 2006; REIS *et al.*, 2008).

Há de se ressaltar que como o teste não é espécie-específico, ocorrem reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, dificultando o seu uso em áreas endêmicas também para a doença de Chagas. Este fato de considerável relevância porque alguns pacientes atendidos no Ambulatório de Dermatologia/HUB provêm de regiões com estas características. Walton, Brooks e Arjona utilizaram formas amastigotas

provenientes de células VERO mantidas em cultura como antígenos para RIFI e não observaram reações inespecíficas em soros de pacientes com outras parasitoses.

As RIFI's positivas demonstraram reação a partir da primeira diluição (1:20), mas para fins de diagnóstico e cálculo da sensibilidade, a positividade foi considerada a partir da segunda diluição (1:40). Não se relacionou os maiores títulos em amostras provenientes de pacientes com a forma cutâneo-mucosa. Apesar da maior parte dos pacientes relatar lesões com até 6 meses de curso, pode-se afirmar que a eficiência da RIFI foi satisfatória, ao contrário do que seria esperado de acordo com a literatura, a qual relaciona baixa eficiência do método frente a infecções recentes.

Mesmo não sendo adotado de forma padronizada para o diagnóstico da LTA no Brasil, o exame histopatológico é amplamente empregado no encerramento de casos clínicos, sobretudo naqueles com possibilidade de falhas no diagnóstico (MENEZES DA SILVA *et al.*, 2007).

Os achados histológicos se correlacionam com a forma clínica e o estágio da doença. No início da infecção, há um processo inflamatório misto, denso e difuso em toda a derme. Este infiltrado é composto predominantemente por macrófagos e também por linfócitos e células gigantes. As leishmânias são encontradas, primariamente, como amastigotas dentro dos macrófagos (corpúsculos de Leishman), no entanto, quando em grande número, elas também podem ser encontradas no espaço extracelular (MEHREGAN, 1999). As formas clínicas reunidas neste trabalho (cutânea e mucosa) são caracterizadas por um intenso e difuso infiltrado inflamatório de células mononucleares, escassez parasitária e presença variável de alterações no epitélio de revestimento tais como ulceração, exocitose de linfócitos e hiperplasia (CARNEIRO, 2009).

No que se refere aos testes propostos, passaremos a analisar o método imunoenzimático utilizando exo-antígenos de *L. mexicana*. O ELISA exo-Ag detectou anticorpos, acima da faixa de corte, em 89 de 98 amostras, demonstrando sensibilidade de 90,8 %. Foi observado que o método proposto apresentou-se na média quando comparados com índices de testes positivos obtidos por outros autores, utilizando antígenos diferentes. Ao aprofundar mais a análise da performance do ELISA exo-Ag, nota-se que sua sensibilidade tem valores próximos àqueles trabalhos nos quais

pesquisadores utilizaram frações antigênicas purificadas por cromatografias, com resultados igualmente satisfatórios (GOMES-SILVA *et al.*, 2008; VIDIGAL *et al.*, 2008).

O parasito íntegro utilizado como antígeno apresenta pedaços da membrana, a qual abriga glicoproteínas que por sua vez são altamente antigênicas em função da constante exposição ao sistema de defesa do organismo hospedeiro. Apesar de ser constituído por glicoproteínas não pertencentes à membrana do parasito, o ELISA *exo-Ag* comportou-se de forma semelhante no que tange à sensibilidade de testes imunoenzimáticos que empregaram formas promastigotas na sua totalidade como antígenos (YONEYAMA *et al.*, 2007).

Ao comparar os resultados positivos no ELISA *exo-Ag* com aqueles obtidos pelas técnicas rotineiras, observou-se relativa concordância entre este método e aqueles que se baseiam em reações anticórpicas, como a RIFI, a qual demonstrou elevada sensibilidade dentre os métodos adotados no diagnóstico de rotina da LTA.

A especificidade do método de ELISA *exo-Ag* quando o grupo controle foi formado apenas com soros de pacientes aparentemente sadios ($n = 80$) demonstrou positividade em 7 (8,7%) amostras. Nota-se a possibilidade de reatividade cruzada nestes casos de falsos positivos, uma vez que o recrutamento dos pacientes para esta etapa baseou-se tão somente em dados fornecidos em pequena entrevista com o possível participante. Desta forma, não é possível excluir as infecções subclínicas seja de LTA ou de outra doença que possam produzir ligações anticórpicas inespecíficas.

Os valores das especificidades quando foram testados soros de pacientes chagásicos ($n = 24$) exibiram valores medianos. A pesquisa bibliográfica revelou especificidades que variam desde a total falta de especificidade (MENDES *et al.*, 2007), passando por baixos valores (5,5%, obtido por YONEYAMA *et al.*, 2007) até 83,33% (VIDIGAL *et al.*, 2008), este último empregando antígeno glicoprotéico purificado, teoricamente, menos propenso a reações inespecíficas.

Contudo, mantém-se a ocorrência das reações cruzadas com outros tripanosomatídeos, provavelmente pela presença de determinantes antigênicos próximos em termos de estrutura (VEXENAT *et al.*, 1996; SZARGIKI, 2005; MENDEZ *et al.*,

2007). Desta forma, nota-se que ainda há necessidade de se purificar os antígenos do ELISA proposto, para melhor especificidade frente a outras parasitoses, como a doença de Chagas (SZARGIKI, 2005; MARCUSSI *et al.*, 2006).

Na purificação de lisado de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* por intermédio da cromatografia em coluna de exclusão molecular, duas frações apresentaram maior especificidade, discriminando assim os pacientes sabidamente positivos para LTA frente a outras parasitoses (MARCUSSE *et al.*, 2006). A purificação dos antígenos utilizados pode dessa forma melhorar a especificidade das técnicas utilizadas. GOMES-SILVA *et al.*, 2008, realizaram ELISA cujos antígenos eram frações antigênicas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, obtidas por cromatografia de afinidade. Os resultados revelaram diferentes sensibilidades que variaram de 19 a 84% para as frações antigênicas da *L. amazonensis* e 60 a 95% para as frações da *L. braziliensis*. A especificidade de cada fração também foi avaliada, variando de 54 a 71% (*L. amazonensis*) e 53 a 66% (*L. braziliensis*).

Quando submetido à teste com amostras de doentes portadores de doenças reumáticas (n = 33), foram observadas reações inespecíficas em número considerável nos soros cujos marcadores estavam presentes em altas concentrações. Destaca-se aqui a proteína C reativa, em que houve reação positiva no ELISA com exo-Ag em 6 das 7 amostras. Esta proteína, um anticorpo do tipo IgM, está presente em quadros inflamatórios e seus altos níveis parecem determinar alta reatividade cruzada da técnica imunoenzimática proposta e, por consequência, alta inespecificidade. Por outro lado, tal afirmativa carece de informações científicas que corrobore ou que a contrarie, impedindo maiores inferências dos resultados obtidos.

Frente às amostras de pacientes portadores de micoses profundas (n = 9), observou-se 2 reação com absorbância acima da faixa de corte. As amostras cujas reações foram positivas são de pacientes portador de esporotricose. A análise da literatura demonstra que a leishmaniose cutânea pode ser confundida com a esporotricose, seja por sinais clínicos como por reações cruzadas em testes imunológicos, sendo importante o diagnóstico diferencial entre as duas infecções (SANTOS *et al.*, 2007). Para tornar ainda mais incerto este cenário, num estudo

publicado em 2005 por BARROS et al., 23% de pacientes portadores de esporotricose apresentaram reação positiva no ELISA para sorologia de leishmaniose. Faz-se importante lembrar que não se deve desprezar a possibilidade, ainda que pequena, de co-infecção por *Sporothrix schenckii* e *Leishmania* conforme outrora demonstrado (AGUDELO et al., 1999).

Em 2007, Paes observou reatividade cruzada em teste de ELISA para esporotricose, utilizando exo-antígenos de forma filamentosa de *S. schenckii*, ao testar amostras com soros de pacientes portadores de LTA. O pesquisador referiu maior positividade quando da pesquisa de anticorpos do tipo IgM nos isotipos estudados, denotando evidente inespecificidade. Ao que indica, os resultados obtidos no presente estudo vem ao encontro do verificado em outros trabalhos.

Ao verificar reações inespecíficas com considerável grau de ocorrência, nota-se a necessidade da realização de trabalho futuro no sentido do estudo das reações imunoenzimáticas utilizando frações antigênicas dos exo-antígenos de *L. Mexicana*. Ou ainda sugere-se que seja realizada separação das proteínas que o compõem para teste de imunoblot contra soros de pacientes portadores de outras doenças, com objetivo de verificar bandas menos reativas que proporcionem especificidades mais altas.

Os métodos sorológicos apresentam limitações tais como a ocorrência de resultados positivos em pacientes curados, o que os invalidam nos casos de pacientes com recidiva da doença, além da reatividade cruzada observada contra *Leishmania chagasi* e *Trypanosoma cruzi* (VEXENAT et al., 1996) e outras doenças tais como Hanseníase Virchowiana, Pênfigo Foliáceo Sulamericano e outras.

A RIFI possui sensibilidade relativamente alta, porém, variável: entre 34-82,9% (RODRIGUES et al.; 2002; GARCIA et al., 2005; ROMERO et al., 2005; FERREIRA et al., 2006; PERLES et al., 2006; REIS et al.; 2008). Além disso, os maiores títulos normalmente ocorrem em pacientes com múltiplas lesões ou com a forma cutâneo-mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), fato atestado neste trabalho.

Os ensaios imunoenzimáticos demonstraram resultados mais uniformes, com variações menores nas sensibilidades encontradas pelos diversos autores que trabalharam com o antígeno bruto: entre 85 a 100% (PEDRAS et al., 2003; FERREIRA

et al., 2006; YONEYAMA et al., 2007). Em relação aos testes imunoenzimáticos com frações antigênicas de *L.braziliensis*, os resultados, em termos de sensibilidade, variaram de 60 a 95% (GOMES-SILVA et al., 2008).

De uma maneira geral, ao propor um grupo controle composto tanto pelas amostras de indivíduos aparentemente sadios (sem LTA) e amostras de indivíduos com doenças diversas, a especificidade do ELISA proposto exhibe valor de 79,3% (Tabela 27). Ao analisar ainda o valor preditivo positivo calculado (73,5%), fica evidente a necessidade de evolução quando o kit é exposto à amostras de pacientes “não LTA”, pois, neste caso, quase 1/3 das amostras demonstraram resultados falsos-positivos.

Quanto à IFD, no presente estudo este método proposto demonstrou sensibilidade satisfatória, inclusive superior àquela obtida pela pesquisa direta de amastigotas em lâmina corada pelo Giemsa. Em números relativos, a IFD foi 45% mais sensível do que a técnica de pesquisa direta de amastigotas em lâmina, da qual partilha a mesma forma obtenção de amostra. A utilização de um anticorpo marcado com substância fluorescente conferiu maior capacidade de visualização das formas amastigotas do que aquelas presentes em lâminas coradas na pesquisa direta, as quais, provavelmente, passariam despercebidas, mesmo por técnicos experientes.

Quanto à especificidade, a IFD demonstrou eficiência, uma vez que houve reação inespecífica, caracterizada pela fluorescência de estruturas semelhantes à forma amastigota, em apenas 2 (3,7%) das 55 amostras analisadas. Estas estruturas eram levemente ovaladas e com tamanho ligeiramente maior que o de uma *Leishmania*. Ainda assim, o valor preditivo positivo do teste mostrou-se elevado, com 96,2%. Desta forma, a IFD quando positiva, tem a característica de indicar infecção por *Leishmania* com elevado grau de confiabilidade. A pesquisa dos prontuários dos 2 casos em que houve reação revelou como diagnósticos cromomicose e esporotricose, denotando uma provável inespecificidade, a qual deve ser estudada no futuro, em outras doenças infecciosas, sobretudo aquelas causadas por fungos. Mello, Schubach e Madeira, 2011, relataram a presença de diversas estruturas elipsóides e arredondadas, dentro e fora de macrófagos em paciente com lesões ulceradas, destacando a semelhança com parasita

do gênero *Leishmania*. Neste caso, a cultura micológica revelou a presença de *Sporothrix schenckii*.

A acurácia da IFD foi de 82,7%, pois, apesar da elevada especificidade, o método, assim como o exame histopatológico e a pesquisa direta de amastigotas em lâmina, depende da presença do parasito no *imprint*, influenciando diretamente na sensibilidade da técnica.

Diversos são os resultados de trabalhos que empregaram a IFD, no entanto, tal metodologia é aplicada à amostras de cães com LV (MOREIRA et al., 2002; MOREIRA et al., 2007). A literatura carece de trabalhos que empreguem a IFD no diagnóstico da LC para efeitos de comparação e discussão ainda mais aprofundadas.

Deve ser registrada a facilidade de realização da IFD, pois há apenas uma etapa de incubação, de 30 minutos, de forma que em 1 hora é possível o preparo de 30 lâminas (15 pacientes) para leitura em microscópio de fluorescência. Por outro lado, é preciso ainda considerar que há limitações neste estudo, pois a coleta do material é um método invasivo e requer a presença de um profissional especializado e de condições sanitárias adequadas. Sugerem-se estudos com outras formas de coletas, como a aposição direta da lâmina na borda da lesão ou ainda a confecção da lâmina com o aspirado da lesão retirado com agulha e seringa.

Os exames parasitológicos de lesão devem ser sempre o método de escolha primário para confirmar o diagnóstico clínico, pois consistem no método de certeza. Entretanto, em estudos epidemiológicos que visam o controle em áreas endêmicas, as técnicas sorológicas são as mais adequadas, pois possibilitam a análise de maior número de pacientes, e neste rol de técnicas, o ELISA exo-Ag demonstrou atributos que o torna passível de ser empregado com este intuito.

Há de ser ressaltado que as técnicas parasitológicas apresentam limitações, uma vez que utilizam tecidos e a sensibilidade delas depende do número maior de amostras testadas. Outra limitação é a impossibilidade de automação aliada à subjetividade, que está diretamente relacionada com a experiência do profissional que realiza o teste, principalmente quando em área endêmica.

No caso da pesquisa direta em lâmina, a literatura traz grande variação, com valores que vão de 14 a 89,7% (RODRIGUES et al.; 2002; SAMPAIO et al.; 2002; PERLES et al., 2006; MENEZES DA SILVA et al., 2007; REIS et al., 2008; LUZ et al., 2009).

A cultura também não é diferente, com grandes variações nas sensibilidades encontradas, que podem ocorrer por diversos fatores, desde a técnica correta, a destreza do laboratorista e o número de tubos inoculados. Foram verificados valores entre 28,6 a 89% (SALINAS et al., 1989; MARZOCHI et al., 1993; ROMERO et al., 1999; WEIGLE et al., 2002; SAMPAIO et al., 2002; RODRIGUES et al.; 2002, CHOUHI et al., 2009; LUZ et al., 2009). SZARGIKI, em 2005, verificou que em meio de cultura coração-cérebro-sangue (CCS) as leishmânias cultivadas apresentaram maior taxa de crescimento do que utilizando o ágar NNN, principalmente os tubos contendo *L. braziliensis*, de crescimento mais fastidioso em meios de cultura.

A realização de testes em meio de cultura é laboriosa e possui alto índice de contaminação, contribuindo para que ocorram testes falsos negativos. Durante o acompanhamento das culturas, observou-se que houve contaminação bacteriana em 12 (12,4%) amostras, nos 2 tubos, o que, certamente elevou o índice de negatividade desta técnica.

O exame histopatológico é empregado no diagnóstico de rotina da LTA quando este é feito em ambulatório. A identificação das leishmânias ao exame histopatológico aumenta à medida que a lesão evolui, com o surgimento dos granulomas epitelióides na derme superior que podem infiltrar toda a derme. A sensibilidade do exame histopatológico é baixa devido à escassez de parasitas ou distorção dos amastigotas ao fixar o tecido, o exame histopatológico da biópsia de pele é muito mais útil para o diagnóstico diferencial, já que estabelece outras etiologias (WEIGLE et al., 1987).

Os granulomas são envoltos em infiltrado de histiócitos e linfócitos. Nesta fase, as leishmânias são identificadas em 50% dos casos (MEHREGAN, 1999). No mesmo trabalho, o autor citado relatou positividade de 38% em cortes histológicos de tecidos que albergam a espécie *L. braziliensis*. No presente estudo, a técnica histopatológica detectou apenas a presença do parasito em apenas 22% .

À luz da clínica, o não encontro das formas amastigotas na lâmina não exclui a possibilidade da infecção. Na ausência do parasito, em muitos casos clínicos o diagnóstico baseia-se na descrição do quadro inflamatório microscópico da lesão em laudo compatível com LTA (MAGALHÃES et al., 1986). A presença de um quadro celular compatível com LTA é considerada um dado relevante que, na falta da evidência do parasito em técnicas parasitológicas e, sobretudo, quando a epidemiologia e o quadro clínico se complementam, é decisiva para fechamento da hipótese de diagnóstico.

Contudo, o quadro celular plausível com a infecção por leishmânia foi importante a ponto de, clinicamente, ter o resultado considerado como “compatível” na maior parte daqueles laudos nos quais não foi evidenciada a presença do parasito. Ou seja, mesmo diante do resultado negativo, a celularidade exibida pelo tecido da lesão cutânea do paciente foi fator determinante para a confirmação da hipótese de diagnóstico em 63% dos casos clínicos. RODRIGUES et al., 2000, ao considerar os casos “indicativos da presença de parasitas”, reportou 89% de “positividade” pelo exame histopatológico.

A histopatologia depende de diversos fatores para consecução de um exame de boa qualidade, tais como: coleta correta por parte do clínico que realiza a biópsia, tratamentos químicos, emblocação em parafina, cortes histológicos, coloração e experiência do profissional observador da lâmina. Além destes fatores que podem ocasionar falhas no diagnóstico (MENEZES DA SILVA et al., 2007), morfológicamente, os parasitos da espécie *L. braziliensis* apresentam tamanho diminuto e escassas em lesões mais antigas, dificultando o achado em cortes histológicos.

A discussão nos parágrafos acima acerca do exame histopatológico vem reforçar a limitação principal desta técnica que é a baixa sensibilidade, podendo variar, sobretudo, quando a *L. (V.) braziliensis* é a espécie presente, como é o caso deste trabalho.

Ao trabalhar com as duas técnicas propostas, veio a questão: “Seria possível diagnosticar a leishmaniose nos pacientes incluídos utilizando apenas estes 2 testes?” Para responder esta questão, foi montada a Tabela 25, de onde se infere que naqueles pacientes em que foi possível realizar tanto o ELISA exo-Ag quanto a IFD (n = 64), o diagnóstico positivo em pelo menos 1 dos métodos ocorreu em 61 (95,3%) pacientes.

Desta forma, nota-se que as duas técnicas propostas contribuíram para a obtenção de sensibilidade mais elevada, com aumento também na especificidade média, levando ao aumento da acurácia. Com isso, é possível verificar que nestes casos, o diagnóstico da LTA seria possível em quase todos os pacientes. Fica a possibilidade da adoção dos testes em conjunto, onde se nota complementação naquilo que um tem de limitação e o outro tem de vantagem: ELISA exo-Ag muito sensível e com especificidade razoável, enquanto que a IFD é menos sensível, porém, possui alta especificidade.

Quanto à PCR realizada neste estudo, a sensibilidade de 74,6 % mostrou-se inferior àquelas obtidas em outros trabalhos, sobretudo os que utilizaram *imprint* em papel de filtro como amostra, nos quais a eficiência do método foi maior (ROMERO et al., 2009). Se comparada às PCR's aplicadas à amostras obtidas da lesão, como nos trabalhos de GARCIA et al., 2005 e BARBOSA GARCIA, 2005, nos quais o primer usado foi o mesmo deste estudo, nota-se que os resultados demonstraram sensibilidade concordante.

Frente aos resultados da PCR realizada a partir de amostras obtidas da biópsia da lesão (que não por *imprint* de papel de filtro), nota-se concordância da sensibilidade em alguns casos (REIS et al., 2008; BERZUNZA-CRUZ et al., 2009; LUZ et al., 2009) ao passo que a eficiência da PCR executada neste trabalho foi inferior aos encontrados em outros (BELLI et al., 1998; AVILES et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002).

Deve-se creditar essa sensibilidade mediana da PCR ao ato da coleta do *imprint* no papel de filtro nos primeiros pacientes. Ao analisar os resultados negativos da PCR, observou-se que os mesmos ocorreram com maior frequência naquelas amostras coletadas no início deste trabalho, demonstrando que a familiaridade com a técnica pode ter influenciado nos resultados. Outro fator a considerar é o tempo no qual as amostras ficaram acondicionadas, uma vez que as amostras mais antigas datavam de 2007, justamente aquelas em que a sensibilidade foi menor. Nestes casos, o DNA alvo pode ter se degradado. Apesar de extensa pesquisa na literatura, não foi encontrado nenhum trabalho que trouxesse argumentação condizente com esta observação.

Quando analisados os resultados da PCR de acordo com as formas clínicas da LTA (Tabela 27), o padrão de detecção mantém-se na forma cutânea, com 74,1% de sensibilidade. Em pacientes com a forma cutâneo-mucosa, a sensibilidade foi maior

(83,3%), resultado que não foi consoante à teoria que versa sobre a escassez de parasitos em lesões mucosas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2007). Esta observação, provavelmente, reforça a maior sensibilidade da PCR, mesmo em situações onde há baixa quantidade de parasitos, quando comparada às técnicas que visam encontrar o parasito. Porém, esta afirmação ainda pertence ao campo das especulações, uma vez que o número de pacientes com lesões mucosas e que tiveram amostras colhidas para a realização da PCR foi pequeno (apenas 6).

As reações de RFLP demonstraram excelentes resultados com a produção de bandas de tamanhos variados, mas específicos em relação ao subgênero (VOLPINI et al., 2004), neste caso, fragmentos de 80 e 40 pb, naquelas amostras que apresentaram digestão pela endonuclease de restrição.

Foi observado que das amostras submetidas à RFLP, 43 (91,5%) evidenciaram 2 bandas (80 e 40 pb) consoante ao subgênero *Leishmania Viannia*. Diversos estudos demonstraram a prevalência da espécie *L. (V.) braziliensis* em regiões variadas do Brasil (FALQUETO et al., 2003; GARCIA et al., 2005; ANDRADE et al., 2005; LUZ et al., 2009). No DF, foi observado o mesmo fato por SAMPAIO & DE PAULA, 1999, e por SANTOS, 2009 em sua tese de doutoramento.

Na região Centro-Oeste, local de provável contágio mais relatado pelos pacientes, há estudos que demonstraram a predominância de *L. (V.) braziliensis* (SAMPALIO et al., 1997; SANTOS, 2009; MOTA e SAMPAIO, 2011) além da ocorrência de insetos vetores da espécie *Lutzomia whitmani* na região do Distrito Federal (SAMPALIO et al., 2009). Desta forma, com base nas informações colhidas nos estudos acima relacionados, pode-se afirmar que, provavelmente, a espécie predominante no presente trabalho é a *L. (V.) braziliensis*.

Em 2 amostras a classificação não pôde ser realizada pois a disposição das bandas não seguiu o padrão

Apesar de poucos estudos abordando o assunto, a informação no parágrafo anterior permite hipotetizar sobre a presença de *L. (L.) amazonensis* nestes pacientes baseado nos achados de SANTOS, 2009, onde constatou-se a infecção pela mesma

espécie em pacientes atendidos no HUB após identificação utilizando anticorpos monoclonais, além de PCR-RFLP.

É interessante notar que mesmo os pacientes que relataram terem sido infectados em estados do Norte, Nordeste e no Mato Grosso, locais em que é patente a presença da espécie *L. (L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2007), apresentaram PCR-RFLP indicativa de *L. (V.) braziliensis*. Porém, é um erro descartar a possibilidade da infecção destes pacientes com outras espécies do complexo *Viannia*, sobretudo aqueles nos quais o provável local de contágio foram estados como Maranhão, Rondônia, Acre, Amazonas e Pará (Tabela 4), locais de sabida ocorrência das espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lindenberg* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL, 2007; COELHO et al., 2010).

Ao pensar em políticas públicas de saúde, o fator custo deve sempre ser considerado, sobretudo em países em desenvolvimento, cujos recursos financeiros são escassos. O diagnóstico da LTA, além de demorado, tem custo significativo, uma vez que várias técnicas de diagnóstico são empregadas no intuito de melhorar a sensibilidade. Métodos sorológicos tem boa sensibilidade, porém, carecem de especificidade, enquanto que métodos parasitológicos perdem na sensibilidade e demonstram elevada especificidade.

Por outro lado, há fatores que não permitem a medição direta do seu custo, como o salário do profissional que realiza a técnica, os materiais hospitalares reutilizáveis e que, portanto, necessitam de esterilização, além de insumos hospitalares usados em pequenas frações como o anestésico local, fios de sutura, bandagens para curativo, gaze, ponteiros, energia elétrica etc.

Cada teste teve seu preço unitário final mensurado com base no valor unitário dos produtos hospitalares utilizados a partir de documentos fiscais com prazo de emissão inferior a 1 ano quando da análise, de cotações recebidas via correio eletrônico e telefone, além das frações (diluídas ou não) das soluções empregadas.

O exame histopatológico teve seu preço de custo obtido com dificuldade, uma vez que, mesmo após contato com gestores de laboratórios de anatomia patológica de hospitais públicos, tal informação não era conhecida com certeza. A pesquisa telefônica junto a 4 laboratórios privados do DF demonstrou que os preços praticados variavam

entre 120,00 e 160,00 R\$. Porém, tal dado não traduz a realidade do custo apenas, pois naquela faixa de preço, certamente, estariam incluídos outros valores (como o salário do médico patologista e de outros profissionais), além do lucro líquido do laboratório.

A solução mais razoável encontrada foi verificar junto aos setores de cobrança de hospitais militares de Brasília (Hospital das Forças Armadas, Hospital de Força Aérea de Brasília e Hospital Militar de Área de Brasília) o preço a ser cobrado do paciente para uma biópsia de pele. Nestes hospitais, adota-se a tabela EMFA (Estado-Maior das Forças Armadas) de honorários, onde praticamente apenas o custo do procedimento/técnica é repassado ao paciente, diferentemente da tabela AMB (Associação Médica Brasileira) de honorários médicos. Enfim, o preço considerado para cada exame histopatológico foi de 50,00 R\$, valor que se apresenta como o mais razoável em termos de custos.

A IRM apresentou o segundo custo mais alto dentre os métodos de diagnóstico rotineiros. O frasco contendo o antígeno é repassado pelo Ministério da Saúde, mediante requisição, de forma gratuita. Inicialmente, foi considerado apenas o custo da seringa e da agulha para sua aplicação. No entanto, o montante empregado para sua produção e envio não poderia ser ignorado. Após contato com o Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos, em Piraquara, Paraná, laboratório responsável pela produção do antígeno para a IRM enviado ao HUB, foi obtido o Relatório de Gestão do ano de 2009, o qual trazia a informação do custo unitário de produção de cada antígeno: 50,69 R\$. Como no frasco o volume é de 1 mL e, tendo em vista que é aplicado 0,1 mL do antígeno em cada paciente, cada teste custou 5,30 R\$ (incluindo seringa e agulha). Se levarmos em conta também o fato de que o último 0,1 mL do frasco não corresponde ao volume esperado, o valor de cada teste de IRM será ainda maior.

Para as outras técnicas de rotina para LTA, foram considerados os preços, em reais, dos reagentes e dos demais insumos como seringas, agulhas e lâminas. Cada solução, quando diluída, o seu preço (em gramas ou miligramas) foi ajustado pelo fator de diluição e de acordo com o volume utilizado na reação.

A eficiente alocação de recursos requer resultados mensuráveis. Para tanto, devemos utilizar indicadores que reflitam, da melhor maneira possível, as conseqüências das intervenções adotadas, tais como, coeficientes de mortalidade,

indicadores de morbidade (prevalências, incidências, produtividade ou tempo perdido pela doença, etc.) e a expectativa de vida, por exemplo.

Dentre os métodos de avaliação conhecidos mais comumente utilizados, devemos destacar os seguintes tipos de análise: custo-benefício, custo-efetividade, custo-utilidade, custo-doença, custo-utilização, análise de decisão (Markov) e análise de sensibilidade. De uma maneira geral, o objetivo comum desses diferentes tipos de análise é encontrar a alternativa que proporcione o maior benefício de saúde agregado para um determinado nível de recursos (ao menor custo) e, portanto, proporcionando maior rentabilidade (SPINDEL, 2008). Sintetizando, pode-se afirmar que na análise custo-benefício os benefícios são mensurados na forma de valor em moeda corrente.

O custo por exame do ELISA exo-Ag e da IFD, separadamente, quando comparados aos custos das demais técnicas empregadas para o diagnóstico da LTA, mostrou-se significativamente mais alto. No entanto, ao analisar as técnicas de rotina em conjunto, uma vez que elas são normalmente empregadas de forma concomitante, seu custo, por paciente, foi de 57,09 R\$, valor agora superior ao das 2 técnicas propostas conjuntamente (50,00 R\$).

Nas técnicas de rotina há outros custos que não foram contabilizados por dificuldade na sua mensuração tais como: fração do anestésico aplicado no paciente, fio para sutura e manutenção de biotério para obtenção do sangue de coelho para meio de cultura NNN etc.

Outrossim, além do menor custo, a favor das técnicas propostas deve ser considerada também a rapidez na execução, cujo diagnóstico pode ser emitido em menos de 24 horas. Diante dos resultados obtidos, nota-se que é plausível e possível a substituição das técnicas de rotina em ambiente ambulatorial pelas metodologias propostas, desde que usadas em conjunto, visto que a sensibilidade, a especificidade e a acurácia aumentaram sensivelmente.

A despeito dos avanços em pesquisa, o método diagnóstico deve estar adequado a possibilidades e realidades da Rede de Saúde Pública. A escolha do método mais acessível e eficaz deve ser considerada, uma vez que dele depende a precocidade no início do tratamento do doente (SZARGIKI, 2005).

Com base nos indicadores de validação, os resultados obtidos neste estudo permitem recomendar a implantação do ELISA exo-Ag e da IFD no diagnóstico da LTA. A redução de custos que pode ser possível a partir da produção em escala industrial, possivelmente tornará os métodos empregáveis em serviços de saúde no Brasil.

CONCLUSÕES

VI - CONCLUSÕES

O ELISA exo-Ag demonstrou boa sensibilidade quando comparado aos métodos de rotina. A especificidade variou de acordo com os grupos controles nos quais o método foi testado, demonstrando valores medianos, sobretudo quando incluídos pacientes chagásicos e portadores de desordens reumáticas. Desta forma, o método proposto demonstra a necessidade de aperfeiçoamentos, como purificação e separação para obtenção de bandas específicas, teoricamente menos reativas. Ainda assim, graças ao elevado valor preditivo positivo e à acurácia, o método imunenzimático proposto mostrou-se de grande valia no diagnóstico rotineiro da LTA.

Quanto à IFD, ficou demonstrado o aumento da sua sensibilidade em razão do emprego de anticorpos associados à substâncias fluorescentes. Ressalta-se ainda a elevada especificidade do método dado pelo elevado valor preditivo positivo encontrado, além da rapidez e da simplicidade da reação. O encontro de reações inespecíficas em algumas amostras de pacientes com micoses profundas demonstra a necessidade de mais testes de especificidade.

O custo, por paciente, de cada teste de ELISA exo-Ag e de IFD foi maior quando comparado ao custo das 5 metodologias empregadas na rotina diagnóstica da LTA.

Utilizadas de forma concomitante, as técnicas de ELISA exo-Ag e IFD proporcionam aumento na sensibilidade e na especificidade, o que garante elevada acurácia, de onde se depreende que as duas técnicas poderiam substituir as técnicas de rotina para diagnóstico da LTA.

A PCR-RFLP seguiu o padrão em relação ao subgênero mais frequentemente relatado em estudos pelo Brasil, neste caso *Leishmania Viannia*. Com base na revisão literária da epidemiologia das espécies de *Leishmania* no Brasil, sobretudo na Região Centro-Oeste (de onde era procedente a maioria dos pacientes), pode-se sugerir que o agente etiológico predominante é da espécie *L. (V.) braziliensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUDELO, S.P.; RESTREPO, S.; VELEZ, I.D. Cutaneous New World leishmaniasis-sporotrichosis coinfection: report of 3 cases. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 40: 1002-1004, 1999.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitol.**, v. 22(12): 552-557, 2006.

ANDRADE, M.S.; BRITO, M.E.F.; SILVA, S.T.; LIMA, B.S.; ALMEIDA, E.L.; ALBUQUERQUE, E.L.; MARINHO JR, J.F.; ISHIKAWA, E.; CUPOLILLO, E.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38(3): 229-233, 2005.

ASHFORD, R.W. The Leishmaniasis as emerging 248 and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, 269-281, 2000.

AVILES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F.P.; HARRYS, E. PCR detection and identification of leishmania parasite in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **J. Parasitol.**, v. 85, p. 181-7, 1999.

BARBOSA GARCIA, F.C.; RODRIGUES DOS SANTOS, S.S.; CHOCIAY, M.F.; RAPELA MEDEIROS, A.C.; ROSELINO, A.M.F. Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis (ATL): Comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of leishmania species in skin samples. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80 (3): 339-344, 2005.

BARROS M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; VALLE, A.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; SCHUBACH, T.M.P.; CONCEIÇÃO-SILVA, F., MATOS-SALGUEIRO, M.; MOUTA-CONFORT, E.; REIS.,R.S.; MADEIRA M.; CUZZI, T.; QUINTELLA, L.P.; PASSOS, J.P.S.; CONCEIÇÃO, M.J.; MARZOCHI, M.C.A. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Acta Trop.** v. 93: 41–47, 2005.

BARROSO-FREITAS, A.P.; PASSOS, S.R.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; SANTOS, G.P.; NASCIMENTO, L.D.; MARZOCHI, M.C.; MARZOCHI, K.B. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 103(4): 383-389, 2009.

BELLI, A.; RODRIGUES, B.; AVILES, H.; HARRIS, E. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58: 102-9, 1998.

BERZUNZA-CRUZ, M.; BRICAIRE, G.; SUAZO, N.S.; MONTFORT, R.P.; BECKER, I. PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 104: 691-699, 2009.

CARMELO, E., MARTINEZ, E.; GONZALEZ, A.C.; PIÑERO, J.E.; PATARROYO, M.E.; DEL CASTILLO, A.; VALLADARES, B. Antigenicity of *Leishmania braziliensis* histone H1 during cutaneous leishmaniasis: localization of antigenic determinants. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 9: 808-11, 2002.

CARNEIRO, F.P. **Expressão de marcadores de apoptose e de Foxp3 nas diferentes formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Brasília, 2009, 130 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal.

CATALDO, J.I.; DE QUEIROZ M.F.C.; MOUTA-CONFORT, E.; MADEIRA, M.F.; SCHUBACH, A.O.; DA SILVA, G.; RIBEIRO, F.C.; MOREIRA-VENÂNCIO, C.F.; PASSOS, S.R. Immunoenzimatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 24(5): 289-94, 2010.

CHIARI, C.A.; MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A. Reação de Imunofluorescência Indireta no controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v.15: 298-303, 1973.

CHOULLI, E.; AMRI, F.; BOUSLIMI, N.; SIALA, E.; SELMI, K.; ZALLAGUA, N.; ABDALLAH, R.B.; BOURATBINE, A.; AOUN, K. Les cultures sur milieu NNN dans le diagnostic biologique des leishmanioses. **Pathol. Biol.**, v. 57: 219-224, 2009.

COELHO, L.I.C.; PAES, M.; GUERRA, J.A.; BARBOSA, M.G.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M.E.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasit. Res.**, v. 108(3): 671-677.

CUBA, C.A.C.; MARSDEN, P.D.; BARRETO, A.C.; ROCHA, R.; SAMPAIO, R.R.; PATZLAFF, L. Diagnóstico parasitológico e imunológico de leishmaniose tegumentária americana. **Boletín de la Oficina Sanitaria panamericana**, v. 89(3): 195-205, 1980.

CUBA C.A.C.; MARSDEN P.D.; BARRETO A.C.; ROCHA R.; SAMPAIO R.R.; PARZLAFF L. Parasitologic and Immunologic Diagnosis of American (mucocutaneous) Leishmaniasis. **PAHO Bull.**, v. 15(3): 249-259, 1981.

CUBA, C.A.C.; LLANOS-CUENTAS, E.A.; BARRETO, A.C.; MAGALHÃES, A.V.; LAGO, E.L.; REED, S.G. MARSDEN, P.D. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia – Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. Laboratory Diagnosis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 17: 161-7, 1984.

DATASUS. Sistema de Agravos de Notificação, série histórica de 2001 a 2005. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinan/lta/bases/ltabr.def>. Acessado em 13 de abril de 2009.

DATASUS. Sistema de Agravos de Notificação, série histórica de 2001 a 2009. Disponível em <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinan/lta/bases/ltabr.def> e <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>. Acessado em 18 de novembro de 2010.

FALQUETO, A.; SESSA, P.A.; FERREIRA, A.L.; VIEIRA, V.P.; SANTOS, C.B.; VAREJÃO, J.B.M.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R.; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI JR., G. Epidemiological and Clinical Features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98(8): 1003-10, 2003.

FEINSTEIN, A.R. Clinical biostatistics. Saint Louis: The C. V. Mosby Company, 468 p., 1977.

FERREIRA, M.P.; ROSELINO, A.M.F.; NASCIMENTO, M.M.P.; AIRES, J. M.; FIGUEIREDO; J.F.C. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.48: 215-17, 2006.

GARCIA, F.C.B.; SANTOS, S.S.R., CHOCIAY, M.F.; MEDEIROS, A.C.R.; ROSELINO, A.M.F. Subsidiary methods for the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis (ATL): comparison of sequencing of DNA and PCR-RFLP for identification of leishmania species in skin samples. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, supl. 3: 339-44, 2005.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M.A; AFONSO-CARDOSO, S.R.; ANDRADE, L.R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELLI, A.; JÚNIOR, F.R.; FERREIRA, M.S. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41 (2): 135-141, 2008.

GONZÁLEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J.A. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review). **The Cochrane Colabor.**, Issue 2, 2009.

GRIMALDI, G. J. A simple procedure for the isolation of leishmanial parasites and for the recovery of parasite virulence in avirulent stocks. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78: 560, 1984.

GRIMALDI, G.J. & TESH, R.B. Leishmaniasis of New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Res.**, v. 6: 230-50, 1993.

GUIMARÃES, M.C., COUTINHO, S.G.; ANTUNES, C.M.F. Normas para a sorologia de moléstias parasitárias. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, São Paulo; v. 20: 55-8, 1987.

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

IKEDA-GARCIA, F. A.; FEITOSA, M. M. Métodos de diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Clín. Vet.**, v. 62: 32-8, 2006.

LANUS, E.C.; PIÑERO, J.E.; GONZÁLEZ, A.C.; VALLADARES, B.; DE GROSSO, M.L.; SALOMÓN, O.D. Detection of *Leishmania braziliensis* in human paraffin-embedded tissues from Tucumán, Argentina by polymerase chain reaction. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100(2): 187-92, 2005.

LUZ, Z.M.P.; SILVA, A.R.; SILVA, F.O.; CALIGIORNE, R.B.; OLIVEIRA, E.; RABELLO A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104 (1): 62-66, 2009.

MAGALHÃES, A.V.; MORAES, M.A.; RAICK, A.N.; LLANOS-CUENTAS, A.; COSTA, J.M.; CUBA, C.; MARSDEN, P.D. Histopatology of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania leishmania braziliensis*. Histopatological classification. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 28: 428-30, 1986.

MAGALHÃES, HMTV; COSTA, JML; COSTA, RM; FRANÇA, F; VALE, KC; MARSDEN, P; MAGALHÃES, AV. Mudança no comportamento cognitivo da atitude de uma população de região endêmica do Sul da Bahia diante da leishmaniose tegumentar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23 (1): 49-52, 1990.

MARCUSSI, L.M.; VIDIGAL, C.P.; MARCUSSI, V.M.; MIKCHA, J.M.G.; ARRAES, S.M.A.A.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para o diagnóstico laboratorial de leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39 (3): 187, 2006.

MARTIN, S.K.; THUITA-HARUN, L.; ADOYO-ADOYO, M.; WASUNNA, K.M. A diagnostic ELISA for visceral leishmaniasis based on antigen from media conditioned by *Leishmania donovani* promastigotas. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 92: 571, 1998.

MARZOCHI, M. C., TEIXEIRA, P. C., MARZOCHI, K. F., CONCEIÇÃO, N. F., COUTINHO, W., BRITO, D. B. Vacuum aspiratory puncture system For *Leishmania* culturing, isolation and transport preliminary report; **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 35(3): 301-03, 1993.

MENDES, D.G.; LAURIA-PIRES, L.; NITZ, N.; LOZZI, S.P.; NASCIMENTO, R.J.; MONTEIRO, P.S.; REBELO, M.M.; ROSA, A.C.; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.L. Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon. **Trop. Med. Int. Health**, v. 12(5): 629-36, 2007.

MEHREGAN, D.R.; MEHREGAN, A.H.; MEHREGAN D.A. Histologic Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 17: 297-304, 1999.

MELLO, C.X.; SCHUBACH, A.O.; MADEIRA, M.F. Can yeast-like form of *Sporothrix schenckii* confuse the direct parasitological diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44(1): 127, 2011.

MENEZES DA SILVA, J.A.; MOURA, N.F.O.; ELKHOURY, A.N.S.M.; ALVES, W.A.; SOUZA, M.; OLIVEIRA, S.M.; DANTAS, M.C.S.; OLIVEIRA G.M. Diagnóstico laboratorial da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil, a partir de análise do Sistema Nacional de Informação de Agravos, 2004. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40 (1): 139, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2^a ed., Brasília, 180 p., 2007.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; NUNES, C.M.; SILVA, T.C.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Aplicação da técnica de Imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 39, n. 2: 103-106, 2002.

MOREIRA, M.A.B.; LUVIZOTTO, M.C.R.; GARCIA, J.F.; CORBETT, C.E.P. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Vet. Parasitol.**, v. 145 (3-4): 245-252, 2007.

MURBACK, N.D.N.; NASCIMENTO, R.A.F.; DORVAL, M.E.M.; FILHO, G.H.; NAKAZATO, K.R.O. Leishmaniose tegumentar americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 86(1): 55-63, 2011.

NAVIN T.R.; ARANA F.E.; MERIDA A.M.; ARANA B.A.; CASTILLO L., SILVERS, D.N. Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 42(1): 36-42, 1990.

OLIVEIRA, M.R.F.; MACEDO, V.O.; CARVALHO, E.A.; BARRAL, A.; MAROTTI, J.G.; BITTENCOURT, A.; ABREU, M.V.A.; ORGE, M.G.O.; LESSA, H.A.; MARSDEN, P.D. Estudo evolutivo da leishmaniose mucosa (7 a 17 anos de seguimento) causada por *Leishmania (viannia) brasiliensis* em Três Braços, Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 28: 325-32, 1995.

PAES, R.A. **Antígenos e anticorpos na esporotricose: caracterização e aplicações diagnósticas**. Rio de Janeiro, 2007, 86 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ.

PASSOS, V.M.A., LASMAR, E.B., GONTIJO, C.M.F., FERNANDES, O., DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania*(*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais. Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 91 (1): 19–20, 1996.

PEDRAS, M.J.; ORSINI, M.; CASTRO, M.; PASSOS, V.M.A.; RABELLO, A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diag. Microbiol. Inf. Dis.**, v. 47, 477-85, 2003.

PERLES, T.F.; CURTI, M.C.M.; BARROS, F.M.F.; FERNANDES, A.C.B.S.; ZANZARINI, P.D.; VENZAZZI, E.A.S.; SILVEIRA, T.G.V.; ARRAES, S.M.A.A.; LONARDONI, M.V.C. Características laboratoriais da leishmaniose tegumentar Americana em pacientes com as formas cutânea ou mucosa, na Região Noroeste do Estado do Paraná. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39 (3): 184, 2006.

RAJASEKARIAH, G.H.R.; RYAN, J.R.; YI, L.P.; STIETELER, J.M.; CUI, L.; SMYTHMAN, A.M.; MARTIN, S.K. Optimisation of an ELISA for the serodiagnosis of visceral Leishmaniasis using in vitro derived promastigote antigens. **J. Immunol. Methods**, v. 252(1-2): 105-19, 2001.

RAJASEKARIAH, G.H.R.; SMITHYMAN, A.M.; GUPTA, R.J.; MARTIN, S.K. The utility of exoantigens for detection of *Leishmania* infection. **Military Med.**, v. 172(5): 482-85, 2007.

RAJASEKARIAH, G.H.R.; CARDOSO, L.; DOGCIO, D.A.; MARTIN, S.K.; SMITHMAN, A.M. A novel exo-antigen-based ELISA for the detection of canine leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 78 (4): 616-23, 2008.

REIS, L.C.; DE BRITO, M.E.F.; ALMEIDA, E.L.; FELIX, S.M.; MEDEIROS, A.C.R.; SILVA, C.J.; PEREIRA, V.R.A. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes com leishmaniose cutânea americana no Estado de Pernambuco. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41 (5): 439-43, 2008.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Inf. Dis.**, v. 7 (9): 581–96, 2007.

RODRIGUES, E.H.G.; BRITO, M.E.F.; MENDONÇA, M.G.; WERKHA, R.P.; COUTINHO, E. M.; SOUZA, W.V.; ALBUQUERQUE, M.F.P.M.; JARDIM, M.L.; ABATH, F.G.C. Evaluation of PCR for Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis in an Area of Endemicity in Northeastern Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40 (10): 3572-76, 2002.

RODRIGUES, A.M.; HUEB, M.; RODRIGUES-DOS-SANTOS, T.A.R.; FONTES, C.J.F. . Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniatado de meglumina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39(2): 139-145, 2006.

RODRIGUES, E.H.G. **Validação de abordagens moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco.** Recife, 2000. 168 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, Pernambuco.

ROMERO, G.A.S., SAMPAIO, R.N.R.; MACÊDO, V.O.; MARSDEN, P.D. Sensitivity of lymph node aspiration in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94 (4): 509-11, 1999.

ROMERO, G.A.S., ISHIKAWA, E.; CUPOLLILO, E. et al Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Trop.** v. 82: 25–29, 2002.

ROMERO, G.A.S.; ORGE, M.G.O.; GUERRA, M.V.F.; PAES, M.G.; MACÊDO, V.O.; CARVALHO, E.M. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Trop.**, v. 93: 49-56, 2005.

ROMERO, G.A.S.; NORONHA, E.F.; PIRMEZ, C.; PIRES, F.E.S.S.; FERNANDES, O.; NEHME, N.S.; CUPOLILLO, E.C.; FIROOZMAND, L.; GRAÇA, G.C.; VOLPINI, A.; SANTOS, S.L.; ROMANHA, A.J. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. **Acta Trop.**, v. 109(1): 74-77, 2009.

RYAN J.R, SMITHYMAN A.M., RAJASEKARIAH G.H, HOCHBERG L, STITELER J.M.; MARTIN, S.K.M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Soluble Promastigote Antigen Detects Immunoglobulin M (IgM) and Antibodies in sere from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40 (3): 1037-43, 2002.

SALINAS, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G.; MONTES, G.; SARAVIA, N.G. Detection of amastigotes in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis using the immunoperoxidase method, using polyclonal antibody: sensibility and specificity compared with conventional methods of diagnosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84: 53-60, 1989.

SAMPAIO, R.N.R.; DE PAULA, C.D.R.. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32(5): 523-28, 1999.

SAMPAIO, R.N.R.; ANDRADE, G.B.; PEREIRA, A.C.; DA SILVA, E. A.; CUBA CUBA, C.A. Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras Dermatol.** v. 77(5): 557-61, 2002.

SAMPAIO, R.N.R.; GONÇALVES, M.C.; LEITE, V.A.; FRANÇA, B.V.; SANTOS, G.M.; CARVALHO, M.S.L.; TAUIL, P.T. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar no Distrito Federal. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42(6): 686-90, 2009.

SANTOS, G.P.L.; SANAVRIA, A.; MARZOCHI, M.C.A. et al. Prevalência da infecção canina em áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar americana, do município de Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, no período entre 1992 e 1993. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.38: 161-66, 2005.

SANTOS, G.M. **Identificação das espécies de leishmânia causadoras da Leishmaniose Tegumentar Americana no Distrito Federal**. Brasília, 2009, 98 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Brasília, Distrito Federal.

SANTOS I.B., SCHUBACH, T.M.P.; LEME, L.R.P.; OKAMOTO T, FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; QUINTELA, L.P.; MADEIRA MF, OELHO FS, REIS RS, SCHUBACH AO. Sporotrichosis: the main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 143: 1-6, 2007.

SCHULTE, P.H., PERERA, F.P. **Molecular epidemiology: principles and practice**. London: Academic Press, 244 p., 1993.

SOTO, M.; REQUENA, J.M.; QUIJADA, L.; ALONSO, C. Multi-component chimeric antigen for sero-diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36: 58, 1998.

SPINDEL, R. Economia da saúde e sua importância como instrumento de análise para subsidiar a gestão em saúde. **Einstein: educação continuada em saúde**, v. 6 (2 pt. 2): 80-2, 2008.

STOLF, H.O.; MARQUES, M.E.S.; YOSHIDA, E.L.A.; DILLON, N.L. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Itaporanga, São Paulo (Brasil). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 35(5): 437-42, 1993.

SZARGIKI, R. **Comparação dos métodos diagnósticos em leishmaniose tegumentar americana**. Paraná, 2005. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná.

SZARGIKI, R.; DE CASTRO, E.A.; LUZ, E.; KOWALTHUK, W.; MACHADO, A.M.; THOMAZ-SOCCOL, V. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the State of Paraná, Brazil. **Braz. J. Inf. Dis.**, v. 13(1): 47-52, 2009.

TEIXEIRA-NETO, R.G.; QUARESMA, P.F.; XAVIER, A.A.P.; LIMA, A.C.V.M.R.; FERREIRA, E.S.; GONTIJO, C.M.F. Avaliação da PCR como ferramenta de diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39 (3): 185, 2006.

VEXENAT, A.C; SANTANA, J.M.; TEIXEIRA, A.R.L. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 38 (3): 177-85, 1996.

VOLPINI, A.C.; PASSOS, V.M.A.; OLIVEIRA, G.C.; ALVARO, J.R. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, v. 90 31-37, 2004.

YONEYAMA, K.A.G.; PEDER, L.D.; LONARDONI, M.V.C.; SILVEIRA, T.G.V. Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Paraná State, Brazil. **Braz. J. Inf. Dis.**, v. 11(3): 360-64, 2007.

WALTON, B.C.; BROOKS, W.H.; ARJONA, I. Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. **Am. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 21 (3): 296-99, 1972.

WALTON, B.C.; SHAW, J.J.; LAINSON, R. Observation on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. **J. Parasitol.**, v. 63(6): 1118-9, 1977.

WEIGLE, K. A., DE DÁVALOS, M., HEREDIA, P. et al. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 36, 489-96, 1987.

WEIGLE K.A., SANTRICH, C., MARTINEZ, F., VALDERRAMA, L., SARAVIA, N.G. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: environmental and Behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. **J. Inf. Dis.**, v. 168: 709-14, 1993.

WEIGLE, K. A.; LABRADA, L.A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D.C. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40: 601-6, 2002.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Distribution of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2009. Map production: Control of Neglected Tropical Diseases.**

http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_cutaneous_2009.png. Acessado em 15/01/2011.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Universidade de Brasília - Faculdade de Medicina - Laboratório de Dermatologicologia

Projeto: Estudo das reações de ELISA e Imunofluorescência Direta, como técnicas para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.

Pesquisadores: Killarney Ataíde Soares e Prof^ª. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, abaixo assinado, fui convidado, li e ouvi o presente termo de consentimento, que informa o seguinte:

Estou participando de minha livre e espontânea vontade de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores (médicos, bioquímico e estudantes de Medicina do Hospital Universitário de Brasília). Este projeto tem como objetivo avaliar a sensibilidade e a especificidade de duas técnicas para a realização do diagnóstico da leishmaniose tegumentar: ELISA e Imunofluorescência Direta.

1. Posso desistir de participar na investigação, se assim desejar, bastando para isto comunicar a minha decisão ao investigador e, mesmo desistindo, poderei ficar sabendo dos resultados de exames dos quais tenha participado. Assim, como também, a minha decisão de não participar, não influenciará sobre as decisões do meu tratamento e acompanhamento.
2. O material utilizado para a realização da pesquisa é o mesmo que será coletado para o diagnóstico da doença na rotina do Ambulatório de Dermatologia, por isso não haverá a necessidade de nova coleta de material. A coleta de amostras para os testes raramente está associada com reações indesejáveis, tais como dor local e hematoma.
3. As amostras a serem coletadas são: 4 (quatro) mililitros de sangue, por meio de punção venosa e um fragmento de tecido, retirado por procedimento cirúrgico

(biópsia) a ser realizado em sala apropriada, no próprio ambulatório de Dermatologia do HUB.

4. O procedimento cirúrgico a ser realizado está descrito a seguir: o médico realiza a desinfecção do local com álcool iodado aplicado com pinça e gaze. Em seguida, são colocados os campos cirúrgicos devidamente esterilizados, retirados dos pacotes na frente do paciente. Em seguida, o médico procede a anestesia local com xilocaína 1%, utilizando seringa de carpule e agulha descartável, com aplicação na borda íntegra da lesão, paralelamente à pele. O passo seguinte é a retirada do fragmento de tecido, utilizando “punch” de 4 mm, inserindo-o na borda da lesão. Locais mais vascularizados e em regiões mais sensíveis (face, pescoço e tronco) eventualmente terão o procedimento realizado com “punch” de 2 mm, de menor calibre. Depois, o médico dá início à sutura (fechamento) do local de retirada do fragmento, com fio cirúrgico não-absorvível nº 1 a 5 (a depender do da espessura da pele). Por fim, é colocada pomada de antibiótico e feito um curativo com gaze (sobre a lesão) e fita micropore.
5. A coleta das amostras será feita às quartas-feiras, no período da tarde, durante atendimento ambulatorial no serviço de Dermatologia do HUB, sempre por um médico capacitado.
6. Caso seja necessário o comparecimento do paciente em horário diferente daquele da sua consulta no Ambulatório de Dermatologia do HUB, os pesquisadores se responsabilizarão pelo custo da condução e alimentação do paciente colaborador.
7. Estou esclarecido que esta pesquisa servirá para saber se as técnicas de ELISA e IFD são aplicáveis no diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.
8. Minha identidade será resguardada pelos pesquisadores. (Os dados obtidos pela pesquisa serão divulgados sem identificar os sujeitos que participaram da pesquisa).
9. Os pesquisadores responsáveis assumirão total responsabilidade pela mesma e pelos termos esclarecidos neste formulário.

Brasília, _____ de _____ de _____.

Paciente ou responsável: _____

Data: ____/____/____

Local: _____

Pesquisador responsável: _____

ANEXO 2

FICHA DE ATENDIMENTO DE PACIENTE PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

DADOS DO PACIENTE

Nome do paciente: _____
Número do prontuário: _____ Data do atendimento: ____ / ____ / ____
Residência permanente): _____
Telefone de contato: _____
Sexo _____ Idade: _____ Data de Nascimento: __ / __ / __ Ocupação: _____

DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

Local do provável contágio: _____
Alguma atividade no campo? _____ Há quanto tempo? _____ Local: _____
Tempo da lesão: _____ Local da Lesão: _____
Tipo da lesão: _____ Nº de lesões: _____

Doenças concomitantes:

Doença de Chagas__ Hanseníse Wirchoviana__ Tuberculose cutânea__
Pênfigo foliáceo sul americano__ Micoose profunda (Esporotricose, Cromoblastomicose,
Paracoccidioidomicose)__ Doença Reumática__
Teve Leishmaniose anteriormente: SIM NÃO
Se sim, foi tratado SIM NÃO
Se sim, há quantos meses acabou o tratamento: _____

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Sorologia para Doença de Chagas:
Todos os critérios de inclusão satisfeitos? SIM NÃO
Algum critério de exclusão satisfeito? SIM NÃO

DIAGNÓSTICO

Leishmaniose Cutânea____ LCM _____ LCD_____
Recidiva? _____

ANEXO 3



Commercial In Confidence

DECLARATION OF NO CONFLICT OF INTEREST

Sydney, June 26th, 2007

To Whom It May Concern:

I hereby declare that there is no conflict of interest in Cellabs supplying some of its ELISA, IFA or IFAT kits to Dr Raimunda Sampaio to carry out epidemiological research, nor is there any conflict of interest for Dr Raimunda Sampaio to send to Cellabs from time to time some of her own specimens for verification of analytical results.

Dr Hubert Mazure
Marketing Manager



Cellabs Pty Ltd