

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ANA BÁRBARA SAPIENZA PINHEIRO

**USO SIMULTÂNEO DA INTRADERMORREACÃO DE  
MONTENEGRO E DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM  
INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA: UMA ESTRATÉGIA ACURADA?**

BRASÍLIA

2019

**USO SIMULTÂNEO DA INTRADERMORREAÇÃO DE  
MONTENEGRO E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM  
INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA: UMA ESTRATÉGIA ACURADA?**

ANA BÁRBARA SAPIENZA PINHEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Martins Gomes



Brasília

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P654u Pinheiro, Ana Bárbara Sapienza  
Uso simultâneo da intradermorreação de Montenegro e da reação em cadeia da polimerase em indivíduos suspeitos de Leishmaniose Tegumentar Americana: uma estratégia acurada? / Ana Bárbara Sapienza Pinheiro; orientador Ciro Martins Gomes. -- Brasília, 2019.  
71 p.

Tese (Doutorado - Mestrado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2019.

1. Leishmaniose. 2. Diagnóstico. 3. Acurácia. 4. Teste intradérmico mucocutâneo. 5. PCR. I. Gomes, Ciro Martins, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ANA BÁRBARA SAPIENZA PINHEIRO

**USO SIMULTÂNEO DA INTRADERMORREAÇÃO DE  
MONTENEGRO E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM  
INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR  
AMERICANA: UMA ESTRATÉGIA ACURADA?**

BRASÍLIA

2019

## **COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Ana Bárbara Sapienza Pinheiro

### **USO SIMULTÂNEO DA INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM INDIVÍDUOS SUSPEITOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: UMA ESTRATÉGIA ACURADA?**

#### **UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

Medicina Tropical: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

#### **DATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

30 de janeiro de 2019

#### **BANCA EXAMINADORA**

Dr. Ciro Martins Gomes  
Universidade de Brasília

Dr. Henry Maia Peixoto  
Universidade de Brasília

Dr. Kleyton Carvalho de Mesquita  
Tribunal Regional do Trabalho

Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio – Suplente  
Universidade de Brasília

## AGRADECIMENTOS

A Deus, à Nossa Senhora e aos benfeitores espirituais por permitirem testemunhar a maravilha que é viver.

A minha mãe que sempre apoiou os estudos e a criatividade em busca de minha profissionalização, cuja garra de enfrentar tantos desafios na vida fez com que eu descobrisse quanto sou uma fortaleza que até pouco desconhecia.

Ao meu pai que mostrou perspectivas armadas em “como a vida é bela”, de sua “pituquinha do papai” e trouxe uma “tatauga” de Brasília, um brinquedo que hoje habita a sala que ele repousa.

À vó Gilda, Pequitita, que amorosamente me amparava. Hoje uma terna lembrança.

Ao meu querido esposo que estimulou a minha jornada acadêmica despertando em família o incentivo a desafios científicos.

Pela existência de nossos amados filhos Rafael e Mateus, que de um sopro de vida me trouxeram a superação e o reencontro da fé e da esperança por seus incondicionais amores.

A todos amigos que num universo abençoado sempre estiveram ao meu lado e tanto enriqueceram minha existência.

À Escola de Enfermagem Anna Nery, ao EB, e à Faculdade de Medicina e Núcleo de Medicina Tropical da UNB pela experiência multiprofissional na área de saúde.

Ao orientador de jornada, Ciro, quem me motivou, renovando minhas forças e esperança fundamentais na caminhada rumo a conclusão da minha pesquisa. Exemplo de simplicidade e inteligência, quem me incentivou a superar todos os pequenos e grandes obstáculos que apareceram ao longo da minha jornada acadêmica.

À Dra Raimunda que, com simplicidade e empatia, demonstrou com seu exemplo quanto os indivíduos com leishmaniose necessitavam de apoio nas diversas áreas de conhecimento.

A toda equipe do laboratório de dermatomicologia da UnB e do ambulatório de Dermatologia do HUB.

Pela oportunidade que sinto em poder contribuir com o tratamento de LTA através da recuperação e aprimoramento do diagnóstico desta patologia.

Aos demais membros da banca, professores Henry e Kleyton, que nesta e noutras participações inspiram e enriquecem novas buscas ao desenvolvimento científico em pró da qualidade da assistência no âmbito da saúde.

Por receber uma nova chance da vida. Testemunho que o milagre da existência divina existe.

A todos que me incentivaram: Sou grata.

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1: Ciclo de vida do parasito da Leishmaniose (fonte: (Veras, Bezerra de Menezes, Veras, & Bezerra de Menezes, 2016)).	10
Figura 2: Evolução da lesão ulcerada na leishmaniose tegumentar americana (Neves et al., 2004).	12
Figura 3: Diagnóstico Clínico da LTA (adaptado de:(MS, 2017).	16
Figura 4: Diagnóstico Laboratorial da LTA (adaptado de: (MS, 2017).	17
Figura 5: Estrutura básica de testes em paralelo.	22
Figura 6: Estrutura básica de testes em série e variação proposta em destaque ....	23
Figura 7: Distribuição dos participantes do G <sub>1</sub> pelos testes.	41
Figura 8: Distribuição dos participantes do G <sub>2</sub> pelos testes.	41
Tabela 1: Características principais dos participantes estudados (G <sub>1</sub> ) e controle (G <sub>2</sub> ) com leishmaniose tegumentar americana.	37
Tabela 2: Acurácia diagnóstica dos testes utilizados para classificação de LTA (padrão composto de referência).	38
Tabela 3: Acurácia dos testes PCR, IDRM e IDRM aplicado em série para os resultados positivos e negativos de PCR no G <sub>1</sub> e no G <sub>2</sub> .	39
Tabela 4: Distribuições dos participantes pelos resultados dos testes	42
Tabela 5: Análise univariada de possíveis preditores dos testes de índice.	43
Tabela 6: P-valores relacionados a PCR positivo considerando o local da lesão ....	43
Quadro 1: Principais Características das Formas Clínicas da LTA relacionadas às espécies de Leishmania no Brasil conforme o Teste de Montenegro (Fontes: Neves, Melo, Linardi, & Vitor, 2004).	5
Quadro 2: Validação de um TED (adaptado de: (Fletcher & Fletcher, 2005; Medronho et al., 2008; Rouquayrol & Filho, 2006; Vieira, 2015).	20



## ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Histórico sobre o diagnóstico e controle das leishmanioses nas Américas.	1
1.2	Epidemiologia das leishmanioses.....	4
1.3	Ciclo de transmissão.....	8
1.4	Apresentação clínica.....	11
1.5	Diagnóstico diferencial.....	13
1.6	Fisiopatogenia da LTA humana .....	14
1.7	Estado atual do diagnóstico da LTA.....	15
1.8	Propriedades dos Testes e Exames Diagnósticos (TED).....	19
2	JUSTIFICATIVA.....	24
3	OBJETIVOS .....	26
3.1	Objetivo Geral .....	26
3.2	Objetivos Específicos.....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
4.1	Padrão de referência composto (definição de LTA) .....	29
4.2	Critérios de exclusão .....	29
4.3	Imunofluorescência indireta.....	30
4.4	Imprint em lâmina para microscopia .....	30
4.5	Exame histopatológico.....	30
4.6	Cultura do aspirado da lesão.....	31
4.7	PCR Convencional .....	31
4.8	Testes Índice.....	32
4.8.1	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	32
4.8.2	Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM).....	33
4.9	Análise Estatística .....	34
4.10	Aspectos éticos.....	35
5	RESULTADOS.....	36
6	DISCUSSÃO .....	44
7	CONCLUSÃO .....	55
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
	APÊNDICE 1. Parecer Consubstanciado do CEP.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS

A = Acurácia  
CCPI = Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos  
DTNs = Doenças Tropicais Negligenciadas  
ELISA = Ensaio de Imunoabsorção Enzimática  
E = Especificidade  
G<sub>1</sub> = Grupo de estudo  
G<sub>2</sub> = Grupo controle  
HUB = Hospital Universitário de Brasília  
IFI = Imunofluorescência Indireta  
IFN- $\gamma$  = Interferon alfa  
IL = Interleucina  
IDRM = Intradermoreação de Montenegro  
kDNA = DNA mitocondrial ou cinetoplasto  
LCD = Leishmaniose Cutânea Difusa  
LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana  
*L.(L.) amazonensis* = *Leishmania Leishmania amazonenses*  
LM = Leishmaniose Mucosa  
LV = Leishmaniose Visceral  
*L.(V.) braziliensis* = *Leishmania Viannia braziliensis*  
MS = Ministério da Saúde  
NK = (célula) *Natural Killer*  
PCR = Reação em Cadeia da Polimerase  
OMS = Organização Mundial de Saúde  
OPAS = Organização Pan-Americana para a Saúde  
RFLP = Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição  
S = Sensibilidade  
TED = Teste ou Exame Diagnóstico  
Th1 = Linfócitos T helper 1  
Th2 = Linfócitos T helper 2  
TED = Testes e Exames Diagnósticos  
UnB = Universidade de Brasília  
VPN = Valor Preditivo Negativo  
VPP = Valor Preditivo Positivo

## RESUMO

**Introdução:** A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) encontra-se entre as doenças tropicais negligenciadas com ampla distribuição geográfica e crescente incidência. O diagnóstico precoce da doença é essencial, mas não existe padrão-ouro definido. Propõe-se que testes múltiplos envolvendo a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seja uma estratégia que aumente a acurácia do diagnóstico de LTA. **Objetivos:** O objetivo principal do presente estudo é avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia da IDRM e da PCR em testes múltiplos, realizados nos quadros clínicos compatíveis em comparação a testes de referência no diagnóstico diferencial de LTA. **Metodologia:** A coleta de dados foi realizada entre janeiro de 2015 a dezembro de 2017 no serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Participantes com quadro clínico compatível de LTA alocados nos casos com LTA (n=79) e controles (n=20), realizaram os testes do padrão composto de referência (exame clínico, epidemiológico, imunofluorescência indireta, cultura, microscopia, histopatológico) e os testes índices (IDRM e PCR). **Resultados:** A PCR na população obteve sensibilidade de 74,68%, especificidade de 100% e acurácia de 79,80%. O uso combinado com a IDRM obteve sensibilidade de 97,47%, especificidade de 60% e acurácia de 89,90%. **Discussão:** As análises demonstraram que houve aumento significativo da sensibilidade. Os resultados evidenciam novas perspectivas no manejo clínico do diagnóstico diferencial para LTA através do uso racional da IDRM.

**Palavras chave:** Leishmaniose; Diagnóstico; Acurácia; Teste Intradérmico Mucocutâneo; PCR.

## Abstract

**Introduction:** American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is among the neglected tropical diseases with increasing geographic distribution. Early diagnosis of the disease is essential, but there is no gold standard. The objective of testing the various levels of a Montenegro intradermalimmunoassay (MIDR) and a Polymerase Chain Reaction (PCR) are strategies that leads to a diagnosis of ATL. **Objectives:** The main objective of the present study is to evaluate the sensitivity, specificity, and accuracy of MIDR and PCR in script tests, such as the reference test in the differential diagnosis of ATL. **Methodology:** Data collection was performed between January 2015 and December 2017 at the Dermatology Service of the Hospital Universitário de Brasília (HUB). Participants with ATL-compatible clinical status allocated to groups (G1, n = 79) and control (G1, n = 20) performed the reference composite standard tests (clinical, epidemiological, indirect immunofluorescence, culture, microscopy, histopathological) and index tests (MIDR and PCR). **Results:** PCR obtained a sensitivity of 74.68%, specificity of 100% and an accuracy of 79.80%. The combined use with MIDR obtained a sensitivity of 97.47%, specificity of 60% and an accuracy of 89.90%. **Discussion:** The analysis showed that there was a significant increase in sensitivity. The results show new perspectives in the clinical management of the differential diagnosis for ATL through the rational use of MIDR.

**Keywords:** Leishmaniasis; Diagnosis; Accuracy; Mucocutaneous Intradermal Test; PCR.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico sobre o diagnóstico e controle das leishmanioses nas Américas

As leishmanioses são doenças que afetam diversas partes do mundo há séculos. Existem dois tipos básicos: Leishmaniose Cutânea (LC) e a Leishmaniose Visceral (LV). Nas Américas a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem íntima relação com a evolução humana. Impulsionado pela descoberta do microscópio e pelos conhecimentos disseminados pela Europa no século XIX por Louis Pasteur, a teoria microbiana tornou-se um grande marco para a compreensão das doenças infecciosas, bem como o desenvolvimento de tratamentos e diagnósticos correspondentes (Silva, Lins, & Castro, 2016). No entanto, os desafios do equilíbrio destas interações estão longe de se encerrarem.

O *Leishmania* evoluiu com a humanidade e há relatos e descrições em literaturas do século I d.C. (Basano & Camargo, 2004), quiçá muito antes desta data, confundida pela inexistência de mecanismos apropriados de diferenciação doutras doenças e pela falta de registros que sustente apropriadamente esta hipótese. Sua persistência e adaptabilidade desafia o sistema imune do qual consegue evadir. Peças de cerâmicas encontradas no continente americano pré-colombiano, 400 a 900 anos d.C., tanto no Peru quanto no Equador, ilustram figuras humanas desfiguradas, sugerindo a presença de LTA (Altamirano-Enciso, Marzochi, Moreira, Schubach, & Marzochi, 2003). A LTA também é conhecida como Leishmaniose Cutânea Americana (LCA) (Lainson, 2010).

A interação entre o Velho e o Novo Mundo não se limitou as questões comerciais. A exploração de novos habitats e a migração de pessoas para diferentes ambientes propiciaram um novo cenário epidemiológico na relação parasito-hospedeiro. Intrigantes e misteriosas interações microscópicas baseadas nas adaptações entre as espécies tiveram como fator determinante as condições favoráveis para esta coexistência no processo evolutivo. Com

ampla distribuição geográfica mundial o leishmania foi um destes parasitos. Esta moléstia possui manifestações as quais são popularmente conhecidas pelas denominações: “calazar”, “febre de dum-dum” ou “barriga d’água” (formas viscerais , LV) e “botão de Biskra”, “botão do oriente”, “úlceras de Bauru” ou “nariz de tapir” (formas cutâneas e mucosas, LTA, LCD e LM) (Altamirano-Enciso et al., 2003). As espécies do leishmania possuem íntima relação geográfica e manifestação clínica correspondente, quando patogênico ao ser humano. Um exemplo é a detecção do *L.(L.) tropica* no Velho Mundo e o *L.(V.) braziliensis* nas Américas (Lainson, 2010).

No Brasil, há relatos de casos atribuíveis à LTA no início do século XIX entre os escravos (Furusawa & Borges, 2014). Em 1855, Cerqueira citava a moléstia denominada “botão de Biskra” (LTA), entre os italianos provenientes do Brasil; já, em 1895, Cunningham descreveu a doença visceral na Índia (LV). Em 1898, Donovan evidenciou uma forma de hemoparasita que depois foi denominado de *Piroplasma donovani*; e, em 1903, Ross demonstrou que não eram esporozoários, estabelecendo um novo gênero, qual seja *Leishmania* (FIOCRUZ, 1997; Lindsten, 1999). Em 1903, James Homer Wright, em Boston, identificou o protozoário coletado de material de uma úlcera proveniente de uma criança armênia (*L. tropica*), com suspeita de diagnóstico clínico de “botão do oriente” (úlceras) (Altamirano-Enciso et al., 2003). Em 1909, Lindenberg abordava as lesões cutâneas e nasofaríngeas leishmanióticas, e, no início do século XX, esta preocupação estendeu-se ao Brasil (FIOCRUZ, 1997). As doenças epidêmicas afastavam e comprometiam o ideal de fazer do Rio de Janeiro a nova Paris das Américas, bem como afastavam os possíveis imigrantes de virem trabalhar nas lavouras cafeeiras que perdiam seus trabalhadores escravos por ocasião da libertação dos mesmos. Osvaldo Cruz e Carlos Chagas, a pedido do presidente da época, foram encarregados de desenvolver medidas de saúde pública para o Brasil. Quanto às leishmanioses, Carlos Chagas enriqueceu a área ao questionar a denominação “rizoplasta”, impropriamente conferida por Nicolle em relação a morfologia do parasito relacionado à formação de um flagelo

intracelularmente. Porém, Nicole tornou o estudo experimental da doença viável entre 1908-1910 ao inocular o parasito em cães e macacos (Altamirano-Enciso et al., 2003; Vale & Furtado, 2005).

Na protozoologia das leishmanioses, o jovem Gaspar Vianna (Altamirano-Enciso et al., 2003) dedicou-se em busca de maiores conhecimentos acerca destas “úlceras bravas” no Brasil, responsáveis pelo “nariz de tapir” (tapirus são animais popularmente conhecidos como antas). Úlcera de Bauru é uma denominação correspondente à área geográfica, Bauru, em São Paulo. Vianna batizou como *Leishmania braziliensis* a espécie que identificou. Posteriormente, em sua homenagem, estenderam o nome deste subgênero de protozoário com a palavra *Viannia*. Ele também propôs, na ocasião, o tratamento da úlcera de LTA por meio da solução a 1% de tártaro emético, atribuindo ação inclusive sobre o calazar (LV) e ao granuloma venéreo (Basano & Camargo, 2004; Rezende, 2009). Outros cientistas brasileiros e estrangeiros destacaram-se na busca pelo conhecimento sobre as leishmanias na protozoologia (Lainson, 2010).

Em 1926, Montenegro introduziu na prática médica um teste que utilizava uma suspensão de amastigotas mortas de *Leishmania braziliensis*, que foi denominado Intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou Teste de Montenegro. Estudos foram apresentados ao longo do tempo, aperfeiçoando-se a técnica e analisando-se os resultados bem como suas peculiaridades como ferramenta diagnóstica (Passos, 2004; Skraba et al., 2015).

A partir da década de setenta, outras espécies foram descritas, como resultado do aprimoramento das técnicas de análise e intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos (Basano & Camargo, 2004). No entanto, mesmo com princípios desenvolvidos pelas técnicas de biologia molecular e os avanços tecnológicos, ainda não existe um Teste ou Exame Diagnóstico (TED) que possa ser considerado ideal (padrão-ouro) para as leishmanioses. Os critérios diagnósticos para LTA não estão definidos homogeneamente e aqueles hoje disponíveis não adicionam acurácia diagnóstica suficiente (C.M. Gomes, Paula, et al., 2014). Problemáticas

agregam-se a esta, tais como custo, necessidade de pessoal treinado, infraestrutura, acessibilidade, baixa renda da população afetada, dificuldade de obter diagnóstico em curto tempo para início do tratamento (aumento da duração da doença no momento do diagnóstico, reduzindo a presença de parasitos nas lesões) (C.M. Gomes, Paula, et al., 2014; Thompson, Weigl, Fitzpatrick, & Ide, 2016).

## 1.2 Epidemiologia das leishmanioses

A leishmaniose configura uma das mais preocupantes entre as doenças tropicais negligenciadas (DTNs), com ampla distribuição geográfica e crescente incidência (MS, 2017). No Brasil as principais espécies patogênicas envolvidas na LTA (cujo tropismo refere-se à pele e às mucosas) são: *Leishmania Viannia braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*) e *Leishmania amazonensis* (*L. (L.) amazonensis*), cursando muitas vezes como lesões cutâneas (úlceras) e complicações mucosas desfigurantes com perda de funcionalidade das funções (problemas respiratórios, de deglutição, entre outros). Na América do Sul o *L. (V.) braziliensis* têm sido citado em várias literaturas e correlacionado às formas cutâneas (Krolewiecki et al., 2017).

Dentre as espécies de *Leishmania* que mais foram identificadas pelos órgãos responsáveis pela saúde no Brasil, o *L. (V.) braziliensis* foi identificado em todos os estados avaliados por unidade federada no Brasil, no ano 2005. Em segundo lugar de maior distribuição geográfica, o *L. (L.) amazonensis* apresentou-se nos seguintes estados: Acre, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Rondônia, Santa Catarina e Tocantins. Em terceiro lugar o *L.(L.) guyanensis*, em: Acre, Amazonas, Amapá, Pará e Roraima (MS, 2017).

O Quadro 1 relaciona as principais características das formas clínicas da LTA correspondente às espécies do parasito identificado. Tal doença infecto-parasitária ocorre geralmente em populações rurais. Atualmente, constata-se uma crescente mudança deste perfil epidemiológico, pois há uma



franca expansão desta doença por todo o território nacional, inclusive nas cidades, sem considerar a reconhecida subnotificação de casos (M. S. Andrade et al., 2015; MS, 2017; Soares, Almeida, Sabroza, & Vargas, 2017; Vale & Furtado, 2005).

**Quadro 1:** Principais Características das Formas Clínicas da LTA relacionadas às espécies de *Leishmania* no Brasil conforme o Teste de Montenegro (Fontes: Neves, Melo, Linardi, & Vitor, 2004).

Formas clínicas	Localização	Teste de Montenegro	Espécie de <i>Leishmania</i>
Leishmaniose cutânea	Infecção confinada na derme, com epiderme ulcerada	Positivo	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. leinsoni</i>
Leishmaniose cutaneomucosa *	Infecção na derme, com úlceras. Lesões metatásticas podem ocorrer, com invasão de mucosa e destruição de cartilagem.	Positivo (resposta exagerada)	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i>
Leishmaniose cutânea difusa	Infecção combinada na derme, formando nódulos não ulcerados. Disseminação por todo o corpo.	Negativo (imunidade celular comprometida)	<i>L. amazonensis</i>

\* Leishmaniose cutaneomucosa: poucos casos relatados na Amazônia

Quanto ao panorama internacional das leishmanioses também apresenta ampla distribuição geográfica. A relação vetor viável, parasita infectante correspondente e presença de hospedeiro vertebrado são conjugados às condições favoráveis principalmente em áreas quentes que propiciem estas interações. Inconsistentemente o continente australiano era considerado “livre” de casos autóctones e do vetor atribuído ao *Leishmania spp* (Aguiar & Rodrigues, 2017). Contudo, fortes evidências apontam tanto o parasito quanto um potencial vetor do subgênero *Forcipomyia (Lasiohelea)* nesta região. Os casos de leishmaniose estudados caracteristicamente eram importados. O protozoário já foi identificado em cangurus vermelhos, o

Wallaroo preto e o Wallaby. Curiosamente, a espécie mais identificada por reação em cadeia da polimerase (PCR) nesta ocasião foi a *Leishmania tropica*; principalmente em indivíduos que imigraram ou viajaram para o Afeganistão (casos importados) (Roberts et al., 2015). Esta informação contextualiza o quanto a transmissão deste protozoário e seu vetor podem se adaptar a diferentes condições e habitats. Além disso novos fatores podem contribuir para a disseminação desta doença, como, por exemplo, o campo, área normalmente usada para trabalho rural ou residência de populações de baixa renda, que passa a atender atividades como o turismo rural.

A mudança climática e o aumento da temperatura global (C. S. Mendes et al., 2016) propiciam condições favoráveis para a presença do vetor e, conseqüentemente, do parasito (Hemmer, Emmerich, Loebermann, Frimmel, & Reisinger, 2018). A interferência do homem, seus hábitos, culturas e questões sanitárias estão intrinsecamente inseridas no nicho ecológico dos vetores e do parasito que os infectam (G. L. Dias et al., 2018). Pesquisadores analisaram dados espaciais retrospectivos da leishmaniose relacionando picos de ocorrência da doença em meses que coincidem com o aumento de precipitação, mesmo em períodos frios, no Brasil e no Afeganistão, corroborando com a questão intrínseca da precipitação climática contribuir com esta patologia (Adegboye & Adegboye, 2017; C. S. Mendes et al., 2016). Entretanto, alguns autores associam o aumento do número de casos à presença de climas secos e baixas altitudes (Pinto, Santos, Grimaldi, Ferreira, & Falqueto, 2010).

Estudos recentes sobre o relacionamento parasito-hospedeiro destacam a complexidade dos ciclos de transmissão, já considerado um grande “Enigma enzoótico” (Roque & Jansen, 2014). Este patógeno apresenta relações que incluem desde reservatório de único até de multi-hospedeiros (Baum, Ribeiro, Lorosa, Damasio, & Castro, 2013). Sua relação espaço-temporal (Rosário et al., 2017) é significativamente ampla e sua expansão demonstra-se contínua; bem como o processo de adaptabilidade em evolução com a história humana. Além do vetor possuir hábitos alimentares ecléticos e

oportunistas (Marassa et al., 2013), as condições expressam-se cada vez mais favoráveis para o surgimento do agente etiológico entre habitats interligados, qual seja antropogênicos e de sistemas heterogêneos (silváticos, sinantrópicos, peridomiciliares e urbanos). Estudos revelam que reservatórios de multi-hospedeiros contribuem para a manutenção do *L. braziliensis*. Estas pontes intercambiáveis tomam dimensões desfavoráveis ao ser humano. O desmatamento tem sido relacionado à ocorrência da LTA no Brasil (M. S. Andrade et al., 2015; Ávila-Pires, 1989; Barçante, 2017; Baum et al., 2013; G. L. Dias et al., 2018; Marassa et al., 2013; C. S. Mendes et al., 2016; Mubayi et al., 2018; Tanure et al., 2015; Tonelli, 2017). Em acréscimo (M. S. Andrade et al., 2015) comentam em seus estudos que o *L. (V.) braziliensis* ser o parasita dominante relacionado à LC no Brasil. Neste artigo citaram a estimativa anual de 26.000 novos casos humanos registráveis, mas cuja incidência variaria de 72.800 a 119.600 relacionada ao LTA.

Alguns casos de LTA recidivam, mesmo após tratamento, indicando inclusive uma perspectiva inapropriada de abordagem diagnóstica e resistência parasitária ao fármaco utilizado nos dias atuais (Aguiar & Rodrigues, 2017, 2017; MS, 2017; Murray, Berman, Davies, & Saravia, 2005; L. F. G. Oliveira et al., 2014). Muitos casos são atendidos após anos de investigação e tratamento direcionados a diagnósticos diferentes ao de leishmaniose, trazendo à luz a necessidade de um diagnóstico mais apropriado a esta doença infecto-parasitária.

Considerando-se os últimos anos no que se direciona ao aprimoramento de técnicas de diagnóstico e tratamento, percebe-se que, apesar de esforços realizados, houve uma certa estagnação e poucos avanços têm sido observados nas áreas de diagnóstico e tratamentos efetivos para LTA. Os países mais desenvolvidos demonstraram pouco interesse na pesquisa e estudo desta temática, que conferiu o *status* de doença negligenciada à leishmaniose. Ademais, há um certo grau de complexidade em se desenvolver um teste diagnóstico padrão-ouro (C.M. Gomes, Paula, et al., 2014; Simpson, 1987) para conferir suporte ao tratamento farmacológico

atualmente preconizado. Logo, há necessidade de se qualificar a capacidade diagnóstica que antecede ao tratamento de reconhecidos efeitos tóxicos preconizado para LTA (MS, 2017). A busca de definição diagnóstica em conjunto com a morosidade do próprio processo saúde-doença, sendo a rede pública responsável por absorver grande demanda das doenças negligenciadas, torna cada vez mais inadiável a redução do tempo de resolução dos crescentes casos de LTA, bem como o seu custo final (Biswas et al., 2018; Saldiva, Veras, Saldiva, & Veras, 2018).

Na prática clínica, observam-se outras dificuldades e equívocos para o correto diagnóstico das leishmanioses, que permeiam desde fatores estudados pela epidemiologia (como: acesso ao sistema de saúde, subnotificação, questões socioeconômicas e culturais, falta de adesão ao tratamento, diagnóstico tardio, entre outros) à dificuldade de se concluir um diagnóstico assertivo. Alguns quadros clínicos são inespecíficos frente as características habituais que definem a LTA (Aguiar & Rodrigues, 2017). Tais equívocos contribuem para manutenção e agravamento desta patologia sobre todos os prismas em que ela se insere.

### **1.3 Ciclo de transmissão**

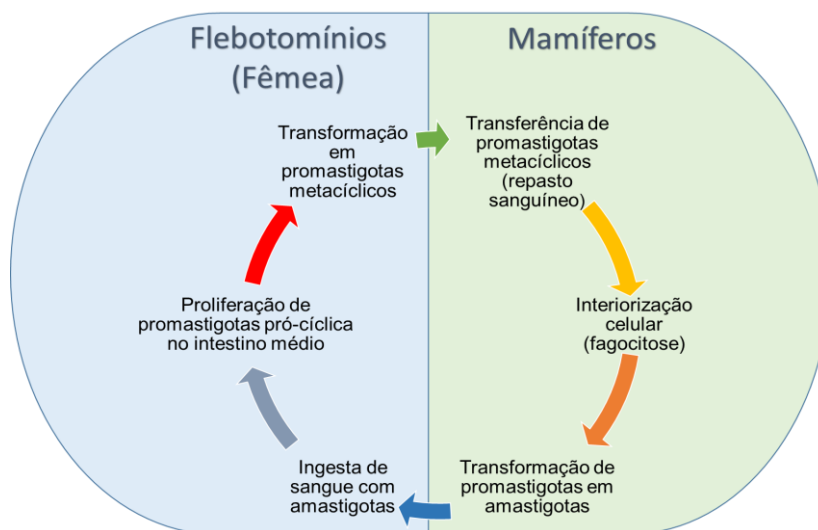
A leishmaniose é uma zoonose causada por protozoários transmitidos pelo vetor popularmente conhecido por “mosquito-palha” ou “mosca-da-areia”. É um inseto flebotomíneo (*Diptera, Psychodidae, Phlebotominae*) tendo as espécies *Lutzomya* e *Psychodopigus* presentes nas Américas. Cerca de 98 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomya* são suspeitas ou confirmadas como vetores de leishmaniose humana. Pesquisadores destacam o fato deste vetor ter competência não somente para o desenvolvimento do *Leishmania*, mas também para outros parasitos como o *Bartonella* e o arbovírus (*Vesiculovirus, Phlebovirus, Orbivirus*) (Bastos et al., 2016; Galluzzi, Ceccarelli, Diotallevi, Menotta, & Magnani, 2018; Shimabukuro, Tolezano, & Galati, 2011). Embora somente a fêmea seja hematófaga (o sangue é

essencial para maturação ovariana e ovoposição), estes insetos se alimentam essencialmente de seiva. A característica específica inclui seu estágio larval em matéria orgânica contida no solo (não na água). São holometábolos e suas fases incluem: ovo, estágio larval, pupa e inseto adulto. Os adultos apresentam dimorfismo sexual, corpo delgado, asas estreitas e hialinas revestidas de longas cerdas e que permanecem eretas e fletidas para cima quando em repouso, diferentemente de outros dípteros (Bastos et al., 2016; Fagundes, 2016). Seu hábito alimentar crepuscular facilita o contato com mamíferos, onde constantemente são identificados em galpões de animais (*Lutzomya whitmani*) e em galinheiros (*Lutzomya longipalpis*) (Baum et al., 2013; Tanure et al., 2015). Até o momento não foram encontrados registros de infecção em aves e anfíbios (Neves et al., 2004).

O gênero do *Leishmania* (MS, 2017), da ordem Kinetoplastida apresentam mitocôndria única, denominada cinetoplasto, e é da família *Trypanosomatidae*, Filo Protozoa (Lainson, 2010; Neves et al., 2004). Ele inclui algumas espécies patogênicas ao homem que, infectado, desenvolve a doença chamada leishmaniose. O ciclo deste protozoário digenético é completado dentro do vetor. Os reservatórios consistem basicamente de mamíferos, entre eles: marsupiais, roedores, cães e humanos. Primatas não estão excluídos deste papel, bem como os gatos, embora seja menos usual (CRMV-MG, 2012; Silveira et al., 1990).

A Figura 1 apresenta o ciclo de vida do protozoário *Leishmania* em suas duas formas básicas, mostrando que durante o repasto sanguíneo de flebótomos infectados, os promastigotas metacíclicos são regurgitados e fagocitados pelas células locais. No hospedeiro humano, as promastigotas metacíclicas (forma flagelada de maior infectividade) se transformam em amastigotas (forma aflagelada, parasitismo em mamíferos) que, ao se replicarem, rompem a célula hospedeira infectando novas células. O vetor que se alimenta de um hospedeiro infectado, pode ingerir o parasito, reiniciando o ciclo do parasito, transformando forma amastigotas em promastigotas pró-cíclicas (Ferreira, 2015; Veras et al., 2016). Morfologicamente, a forma

promastigota possui flagelo extracelular, livre, e corpo alongado. A forma amastigota apresenta flagelo intracelular, sem movimentos.



**Figura 1:** Ciclo de vida do parasito da Leishmaniose (fonte: (Veras, Bezerra de Menezes, Veras, & Bezerra de Menezes, 2016)).

Um fato relacionado aos protozoários tripanossomatídeos consiste justamente em seu DNA mitocondrial (cinetoplasto ou kDNA, correspondendo de 20% a 30% do DNA do *Leishmania*), incomum entre os de outras estruturas encontradas na natureza em: estrutura, função e modo de replicação. Existem dois tipos de círculos de kDNA: minicírculos (10.000 a 20.000 cópias) e maxicírculos (20 a 50 cópias) (C.M. Gomes, Paula, et al., 2014; Shapiro & Englund, 1995; Simpson, 1987).





O período de incubação do parasito, antes das manifestações clínicas varia no intervalo de duas semanas a dois anos. As expressões clínicas estão diretamente relacionadas à espécie correspondente, divididas nas Américas, em: LTA e LV. A forma tegumentar pode ser: Cutânea (LC), Cutânea Difusa (LCD) e Mucosa (LM). Mais de trinta espécies já estão identificadas e cerca de vinte são patogênicas. Destas, oito no Brasil, sendo seis do subgênero *Viannia* (Lainson, 2010; MS, 2017).

#### 1.4 Apresentação clínica

A apresentação clínica das leishmanioses ocorre em duas formas principais, a visceral e tegumentar. As formas viscerotrópicas (LV) acometem órgão como o baço, o fígado, os linfonodos e a medula óssea (LV). As leishmanias dermatotrópicas / mucotrópicas estão correlacionadas às lesões em áreas da pele, mucosas e vias aéreas (Altamirano-Enciso et al., 2003).

A LV também é conhecida por Ka-lazar (do hind. *Kala* = negro e *azar* = veneno) ou febre negra e é uma doença crônica que acomete, através do parasitismo intracelular ocasionado pelo leishmania como o da espécie *L. Donovanii chagasi / infantum*, principalmente o fígado, o baço, a medula óssea e os linfonodos. Observa-se predomínio de casos em crianças principalmente por modulação de respostas intrínsecas do hospedeiro, cujos relatos relacionam casos agravados associados a desnutrição infantil. Os sintomas estão relacionados a disfunção contínua dos órgãos e pode ocasionar desde ascite até a morte do indivíduo infectado (Ferreira, 2015; A. F. Frade, 2011; MS, 2017).

Na LTA, a evolução, quando não ocorre autorresolução de casos assintomáticos, pode consistir no desenvolvimento em nódulo no local da picada, desenvolvendo as úlceras típicas, popularmente chamadas de “feridas bravas” (Neves et al., 2004). A LTA resulta da infecção por *Leishmania* com tropismo cutâneo e mucoso (M. S. Andrade et al., 2015). A Figura 2 apresenta a equivalência entre estágio e histologia desde o processo de infecção (nódulo) até a cicatrização da lesão na leishmaniose tegumentar. Todas as faixas etárias e todos os gêneros estão vulneráveis (Ferreira, 2015; MS, 2017).

	ESTÁGIO	HISTOLOGIA
	Nódulo	Epiderme intacta, forte infiltrado de macrófagos, numerosos parasitos
	Úlceração inicial	Úlceração superficial, forte infiltrado de linfócitos, macrófagos numerosos parasitos
	Úlcera estabilizada com lesão-satélite	Úlcera profunda, processo inflamatório ativo na periferia, lesões-satélites, poucos parasitos
	Lesão cicatrizada	Leve depressão na pele epiderme fina, fibrose dérmica, ausência de parasitos

**Figura 2:** Evolução da lesão ulcerada na leishmaniose tegumentar americana (Neves et al., 2004).

A lesão da leishmaniose cutânea (LC), na sua forma cutâneo limitada, emerge desde uma simples pápula (única ou múltipla). A ulceração em geral apresenta bordas da ferida infiltradas em molduras e são indolores (MS, 2010). A forma mucosa (LM), secundária ou não à cutânea, expressa infiltração, ulceração e destruição que comprometem estruturas do tecido nasal, faringe ou laringe, capaz de causar deformidades desfigurantes e problemas secundários (relacionados à fala, ao trato respiratório e ao trato digestivo). Casos de isolamento social e familiar gerados pela percepção e estigma afastam mais estes seres de um acolhimento para resolução de suas angústias e os distanciam de uma possível cura, mantendo-se um sofrimento por vezes desnecessário e superior ao que precisava existir. Sob o prisma de doença ocupacional gera reflexos socioeconômicos significativos,



comprometendo em geral a renda familiar e a sobrevivência deste indivíduo e seu núcleo familiar.

Apresentações menos frequentes de lesões tendem, tratadas ou não, a uma mudança de carga parasitária e a uma possível autorresolução; com formação de cicatrizes, passando-se despercebidamente da hipótese diagnóstica de leishmanioses (Cota et al., 2016; Quintella, 2010). Indivíduos com anergia imunológica desenvolverão formas com abundância em parasitos como a leishmaniose difusa. Há indivíduos que apresentam forte resposta imunológica celular, não suficiente para cura, que desenvolvem formas crônicas como a lupóide e a recidiva cútis (C.M. Gomes, Paula, et al., 2014).

## **1.5 Diagnóstico diferencial**

Algumas doenças não infecciosas podem confundir-se clinicamente com LTA. Alguns exemplos tangenciam neoplasias, doenças inflamatórias e doenças vasculares (MS, 2017). Formas anômalas já foram atribuídas a doenças como a hanseníase e até mesmo a sífilis. Diagnósticos diferenciais de patologias fúngicas são essenciais em alguns casos, expondo os profissionais de saúde a uma indefinição diagnóstica e decisões randômicas inclusive para definir e sustentar um tratamento. Neste aspecto, não somente o médico e o indivíduo como um todo estão envolvidos. Além do sofrimento pessoal que concretiza a perda de sua qualidade de vida e capacidade laborativa, muitos curativos são realizados por profissionais de enfermagem, desnecessariamente, percebendo-se o retorno contínuo de pessoas com “úlceras”. No entanto, este esforço mútuo e gasto contínuo serão sempre ineficientes enquanto o parasito não for identificado e controlado. Outras profissões são requisitadas, muitas vezes em busca infrutífera, em sistema de saúde pública, incluindo-se psicólogos e assistentes sociais. O gerenciamento de informações diagnósticas reduz o tempo para o início do tratamento, cujo desfecho costuma ser favorável na maioria dos casos de LTA. Vale destacar

que, pelo perfil dos indivíduos acometidos por leishmaniose, a rede pública de saúde é essencial no Brasil. O retorno às atividades remuneradas e a redução do tempo de afastamento para tratamento de saúde agregam qualidade às questões econômicas coletivas de uma nação (Biswas et al., 2018; Saldiva et al., 2018).

Tais observações são relevantes para avaliarmos, mesmo com recursos limitados, uma estratégia diagnóstica diferencial para LTA frente ao que se encontra conhecido cientificamente e pode ser viável nas circunstâncias atuais.

## **1.6 Fisiopatogenia da LTA humana**

Inequivocamente, tanto os produtos da saliva do vetor quanto a carga parasitária, forma e espécie da *Leishmania* são relevantes para a patogênese. A capacidade imune inata desempenhada é fundamental para delinear o processo inicial. A função imunológica nesta relação inclui células efetoras tais como os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* - NK (Cruvinel et al., 2010). A *Leishmania* possui, dentre outros artifícios, a capacidade de evasão do sistema imune através da arte de utilizar o próprio neutrófilo (cavalo-de-tróia) (Shapira & Zinoviev, 2011) para infectar e sobreviver intracelularmente em macrófagos inativos (*naives*). Os macrófagos infectados não conseguem contribuir para manutenção da homeostase do organismo humano. Técnicas como a citometria de fluxo contribuem para o esclarecimento desta interação (Falcão, 2013). Burlando este importante mecanismo de defesa, as condições favoráveis dependem essencialmente (não exclusivamente) do perfil predominante do polo imunológico definido no paradigma Th1 – Th2 (linfócito T helper). Reconhecidamente a polarização tipo 1 é mais favorável. Bem modulada a linfocina IFN- $\gamma$  parece contribuir na contenção de patógenos intracelulares. No entanto, a cicatrização ocorre pela substituição contínua do tecido por fibroblastos gerando uma cicatriz residual. Já a incapacidade de elaborar uma resposta eficaz e a produção de IL (4, 5 e

10, por exemplo) é característica do polo tipo 2, desfavorecendo o indivíduo. Isto porque a desorganizada resposta inflamatória junto com a maior sobrevivência do parasito, ocasionam demora de regressão e agravamento do quadro clínico (maior número de lesões, invasão de mucosas, disseminação), baixa resposta terapêutica e possível reincidência da patogênese (Romão, 2008).

Insolitamente, é nesta polarização que encontramos contratempos nos métodos diagnósticos atuais. Quanto mais eficiente a resposta imune inata, menor quantidade de parasitos conseguimos isolar. Ao longo do tempo de evolução da doença há mudanças da relação entre a taxa de multiplicação de parasitos e eficiência celular do hospedeiro. Os restos deste processo geram exsudato seropurulento, mesmo que em pequena quantidade. As ulcerações clássicas da LTA são descritas histologicamente como dermatite granulomatosa difusa ulcerada e, quando possui borda costuma ser infiltrada e emoldurada.

Em casos por *L. braziliensis* há a apresentação de discreto infiltrado e escassez tanto de macrófagos quanto parasitos, e há ainda a presença de linfócitos e plasmócitos. Co-infecções podem desvirtuar o dificultoso processo diagnóstico. Instigando os cientistas mais ainda, parasitos já foram isolados de locais de cicatrizes tratadas anos antes (MS, 2017).

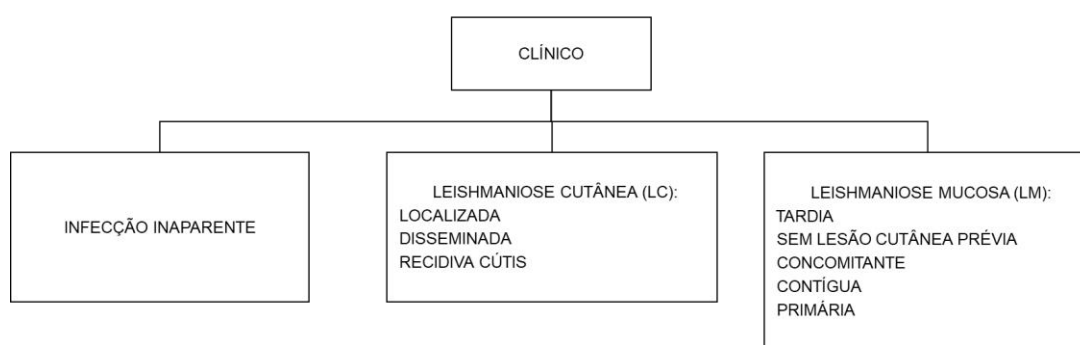
A idiosincrasia mútua da interação entre o parasito *Leishmania* e seu hospedeiro humano ainda não está compreendida de forma minimamente satisfatória para que proporcionemos o equilíbrio da interação controlada sem risco de prejuízo a saúde do hospedeiro humano, caso haja condições favoráveis ao parasito, mesmo que através de intervenção farmacológica (MS, 2017; Scott & Novais, 2016).

## **1.7 Estado atual do diagnóstico da LTA**

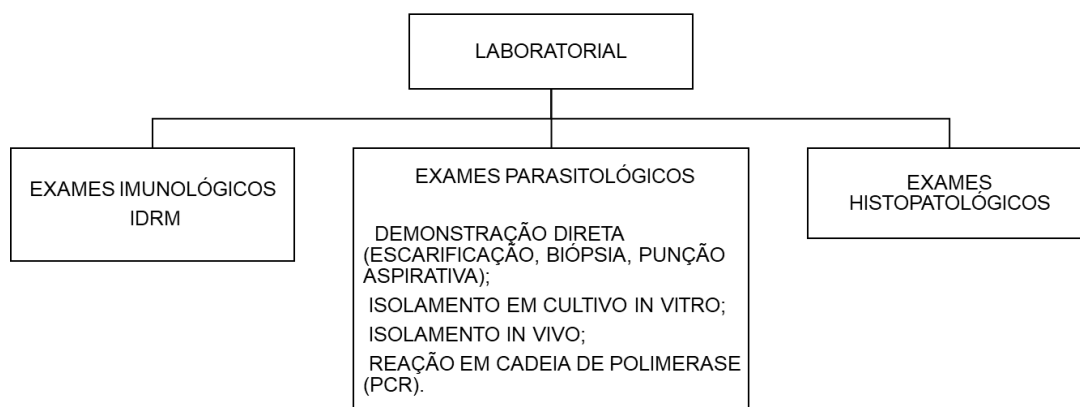
Cientistas conferem como fundamental a imunidade celular na resolução da infecção pelo leishmania (Scott & Novais, 2016), inferindo a

relevância de um teste imunológico. Embora conste no manual do MS como disponível a IDRМ encontra-se fora do mercado, por baixa produção, falta da capacitação dos serviços de saúde em identificar os parasitos em esfregaços das lesões e a falta de distribuição do produto imprescindível a sua execução, o antígeno (Basano & Camargo, 2004). Rumores e questionamentos emergem sobre o retorno da técnica de IDRМ, a qual demonstrou sua utilidade ao longo dos anos que foi utilizado.

O manual do Ministério da Saúde sobre LTA (MS, 2017) propõe que os diagnósticos para lesões sugestivas de leishmaniose tenham base clínico-epidemiológica, complementado pelo IDRМ e eventual prova terapêutica. A PCR, um dos mais avançados entre os TED disponíveis, consiste em método molecular por excelência e tem sido preconizado em centros de referência para diagnóstico de LTA. No entanto, necessita de recursos físicos, econômicos e de pessoal treinado, fatores nem sempre consistentes com a realidade de áreas endêmicas de leishmanioses e que, em geral, encontram-se em distantes dos centros de referência. A Figura 3 apresenta o diagnóstico clínico e a Figura 4 o diagnóstico laboratorial da LTA, preconizado pelo MS.



**Figura 3:** Diagnóstico Clínico da LTA (adaptado de: (MS, 2017).



**Figura 4:** Diagnóstico Laboratorial da LTA (adaptado de: (MS, 2017).

Preconiza-se o conjunto de diagnóstico epidemiológico, clínico e laboratorial durante a investigação diferencial. O diagnóstico que definitivamente sustenta uma conclusão plena é o que contempla o achado do parasito em si. As técnicas correspondentes para captura de amostra basicamente requerem procedimento invasivo, como a biópsia.

Em relação à suspeita de infecção por *Leishmania* é imprescindível salientar a importância da visão multiprofissional para o encaminhamento do indivíduo ao centro de referência (Garbin et al., 2017).

A IDRMM e provas sorológicas são métodos auxiliares. Em relação ao desempenho da IDRMM a tendência de resposta imunológica tipo 1 favorece maior positividade deste teste. Segundo o próprio MS, este teste é uma ferramenta rotineiramente utilizada como avaliação da imunidade celular antileishmaniana, restringindo-se sua compreensão para apurar se houve exposição ao parasito e não que a doença esteja necessariamente em atividade. A imunossensibilidade confere uma positividade com risco de se estabelecer um diagnóstico inadequado, principalmente em indivíduos que residam em área endêmica. Enfim, a quebra da homeostase por exposição ao *Leishmania* pode se apresentar, independentemente da patogênese propriamente estabelecida, e o desempenho da IDRMM demanda atenção a diversos aspectos. Algumas destas observações estão na remissão da

infecção, em teste previamente realizado e em possível casos de imunidade concomitante (Borges et al., 2003; SBP, 2003).

O diagnóstico parasitológico é muito útil na LTA pela identificação microscópica de formas amastigotas (dentro de macrófagos). A técnica inclui tecidos de biópsia, aspirados de lesões ou cultura de tecido, mas pode ser dificultada pela eventual baixa carga parasitária no momento do procedimento (T. A. de O. Mendes, 2015). Observa-se neste método limitações tais como a sua baixa sensibilidade, podendo passar parasitos despercebidamente do melhor microscopista que verifique a lâmina. Para o exame histopatológico o encontro de amastigotas ou de um infiltrado inflamatório compatível pode definir ou sugerir o diagnóstico, respectivamente (Magalhães et al., 1986; Neves et al., 2004).

Os padrões histopatológicos na LTA incluem alterações dérmicas ou do córion das membranas mucosas. As fases básicas são: a reação exsudativa celular, a reação exsudativa e necrótica, a reação exsudativa e necrótico-granulomatosa, a reação exsudativa e granulomatosa e a reação exsudativa e tuberculóide (Magalhães et al., 1986). É essencial a necessidade de treinamento contínuo e boas práticas para que haja eficiência do isolamento de parasito, podendo ter resultados influenciados pelas condições de coleta, manipulação do material e condições de cultivo.

O diagnóstico laboratorial é uma ferramenta de extensa valia para detecção de espécies e contribuição para vigilância epidemiológica, bem como a minimização de agravos. A confirmação e diferenciação do diagnóstico clínico potencializa o uso de métodos terapêuticos disponíveis e otimiza a resolução do quadro clínico patológico. Simultaneamente, confere maior confiança na prescrição de fármacos com elevada toxicidade.

Assim também ocorre no uso da PCR em todas as suas dinâmicas. Apesar de oferecer muitas possibilidades, também encontra certas limitações, principalmente a acessibilidade, o custo, o emprego de laboratório apropriado e de pessoal treinado.

## **1.8 Propriedades dos Testes e Exames Diagnósticos (TED)**

Quanto aos propósitos das tecnologias em saúde, as mesmas são classificadas em: preventivas, de triagem, de diagnóstico, terapêuticas e de reabilitação (Nunes et al., 2015). Dentro deste cenário, TED são tecnologias de diagnóstico que auxiliam na tomada de decisão do tratamento a ser executado. Estabelecer diagnóstico é um processo que confere incertezas que podem ser esclarecidas por métodos conhecidos como testes. Em muitos casos, estes são inexistentes, indisponíveis, caros ou imperfeitos. A ausência de um TED único requer estratégias que reduza a probabilidade de resultados falsos negativos e falsos positivos. O uso de múltiplos testes com características mais sensíveis e específicas podem constituir estratégias que forneçam um desempenho mais eficiente (Fletcher & Fletcher, 2005)

As estruturas atuais para avaliação da eficácia de TED são limitadas, mas os resultados devem ser consistentes e aceitáveis. Neste contexto, precisão (reprodutibilidade ou confiabilidade) é considerada como a consistência de resultados quando a medição ou exame se repete (Fletcher & Fletcher, 2005; Gordis, 2014; Medronho et al., 2008).

É fundamental o equilíbrio entre os benefícios e danos associados a novos testes ou aqueles já existentes. A acurácia confere a validade operacional (Kawamura, 2002; Medronho, Bloch, Luiz, & Wernwck, 2008; Rouquayrol & Filho, 2006).

Neste trabalho, considera-se o arquétipo da clássica tabela 2x2 (Quadro 2) para definição dos termos sensibilidade, especificidade e acurácia na relação entre diagnóstico e resultado de ocorrência de doença verdadeira ou falsa (Fletcher & Fletcher, 2005). A sensibilidade revela a capacidade de um TED identificar a doença entre pessoas realmente doentes. A especificidade revela a capacidade de identificar não doentes entre indivíduos sadios. A acurácia pode ser considerada como a medida de exatidão de um TED frente os resultados obtidos de sensibilidade e especificidade numa

amostra avaliada, que permite relativizá-lo ao padrão-ouro para o diagnóstico de uma doença (C.M. Gomes, 2014). Compreender-se-á a acurácia (ou validade) de um TED como sendo a capacidade para detectar o verdadeiro valor daquilo que é medido, observado ou interpretado.

Pesquisadores definem como TED padrão-ouro aquele que, único ou combinado, seja capaz de representar com fidelidade o real estado do indivíduo, qual seja sadio ou doente em relação à doença investigada (C.M. Gomes, 2014; MS, 2017; OPAS / OMS, 2018). Infere-se que, frente ao analisado, quanto maior a sensibilidade e a especificidade, maior a acurácia de um TED, aproximando-se do padrão-ouro almejado (Kawamura, 2002). O Quadro 2 apresenta a definição dos conceitos de especificidade, sensibilidade e acurácia, além dos Valores Preditivos Positivos e Negativos. O valor preditivo positivo (VPP) reflete a qualidade de um teste identificar corretamente um indivíduo doente. E o valor preditivo negativo (VPN) os não doentes (Guimarães, 1985).

Para investigação, a hipótese diagnóstica será estimada através destas medidas que, associadas à amostra total, podem identificar a acurácia do TED, definindo a proporção de acertos nesta relação entre especificidade e sensibilidade (correlacionados a amostra estudada).

**Quadro 2:** Validação de um TED (adaptado de: (Fletcher & Fletcher, 2005; Medronho et al., 2008; Rouquayrol & Filho, 2006; Vieira, 2015).

Validação de um TED			
Resultado do TED	Doentes (n)	Não Doentes (n)	Total (n)
Positivo	A	B	A + B
Negativo	C	D	C + D
Total	A + C	B + D	A + B + C + D

**Legenda:**

A = verdadeiro positivo (V+)

B = falso positivo (F+)

C = falso negativo (F-)

D = verdadeiro negativo (V-)

Valor Preditivo Positivo (VPP) =  $A / (A + B)$

Valor Preditivo Negativo (VPN) =  $D / (C + D)$

Sensibilidade =  $A / (A+C)$

Especificidade =  $D / (B+D)$

Acurácia =  $(A+D) / (A+B+C+D)$



A incerteza do prognóstico (hipótese diagnóstica) deduz a sua expressão como uma probabilidade melhor estimada recorrendo-se a investigação na pesquisa clínica em busca de evidências que sustentem uma decisão final para determinar um CID e definir o seu respectivo tratamento. Os cuidados atinentes à tomada de decisão quanto ao diagnóstico infringem grande impacto inclusive nos recursos destinados à saúde coletiva.

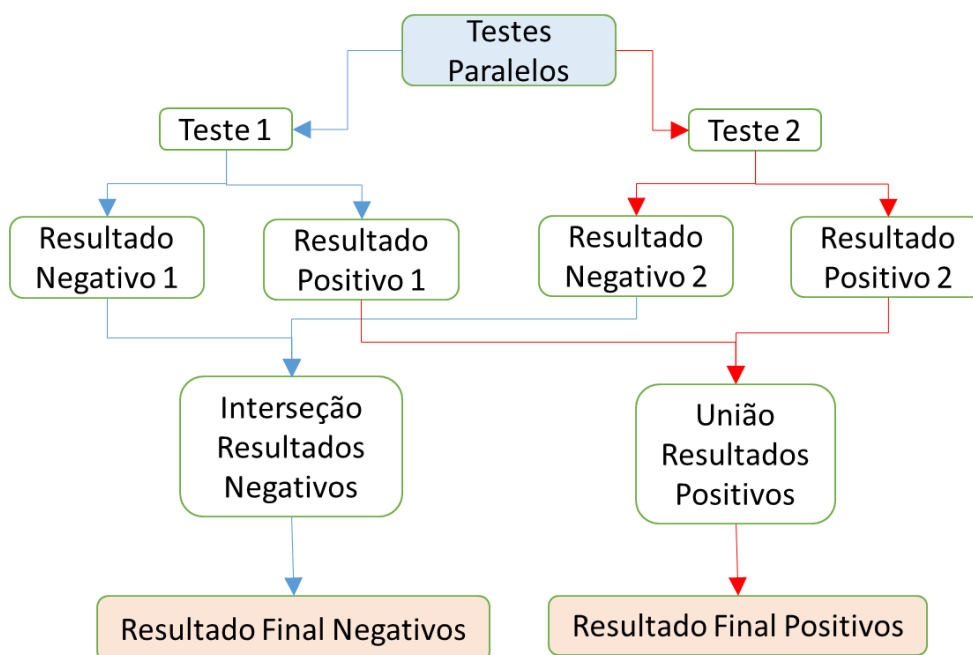
Duas medidas de frequência (quantificação da ocorrência de eventos numa população) de uma determinada doença podem ser consideradas para uma amostra. Uma é a incidência compreendida pelo surgimento de novos casos, inferindo probabilidade ou risco, que se refere as características dinâmicas, inusitadas). Outra medida é a prevalência, ou seja, a existência e duração da doença. Esta pode ser “de período” ou “pontual” e cuja característica “estática” confere observações mais constantes. Outros aspectos devem ser considerados para um panorama epidemiológico mais apurado. A incidência numa região endêmica pode ser refletida na prevalência aumentada encontrada, por exemplo, em centros de referência de diagnóstico e tratamento específico. Parâmetros como sensibilidade e especificidade apresentam maiores resultados em investigações cuja amostra populacional possua alta prevalência (Guimarães, 1985), o que se constitui na realidade encontrada em centros de referência de diagnóstico e tratamento a patologias diferenciadas como as leishmanioses.

A sequência das atividades elaboradas para o diagnóstico deve seguir o padrão estipulado para Boas Práticas (MS, 2011). A acurácia (validação) e a precisão (reprodutibilidade ou confiabilidade) alicerçam os TED na área de saúde (Fletcher & Fletcher, 2005; Thompson et al., 2016).

Os testes múltiplos são estratégias que podem ser aplicadas de duas maneiras: em paralelo e em série; a fim de tornar evidências consideráveis aceitáveis como parâmetro de definição de diagnóstico de uma doença ou agravo (Fletcher & Fletcher, 2005; Garbin et al., 2017; Medronho et al., 2008).

Os testes amparam o diagnóstico clínico, auxiliam quanto a triagem (identificando doença ou agravo à saúde assintomáticos) e contribuem com as evidências científicas em pesquisas. O custo-benefício ocorre frente aos parâmetros que forem delineados e presentes. Alguns recursos como a escolha do tipo de teste, sua repetição ou a combinação com outros disponíveis são utilizados para se definir um diagnóstico final.

O emprego de testes em paralelo (Figura 5) implica em testes simultâneos, e é indicado quando há necessidade de resultados rápidos. Porém isto pode elevar o custo, pois os testes são realizados em todos os indivíduos. Soma-se a união de resultados positivos ( $A \cup B$ ) objetivando-se o aumento da sensibilidade e identificação dos indivíduos doentes, através da redução dos falsos negativos. No entanto a especificidade pode ser reduzida, pela possibilidade de ocorrer o aumento de falsos positivos.

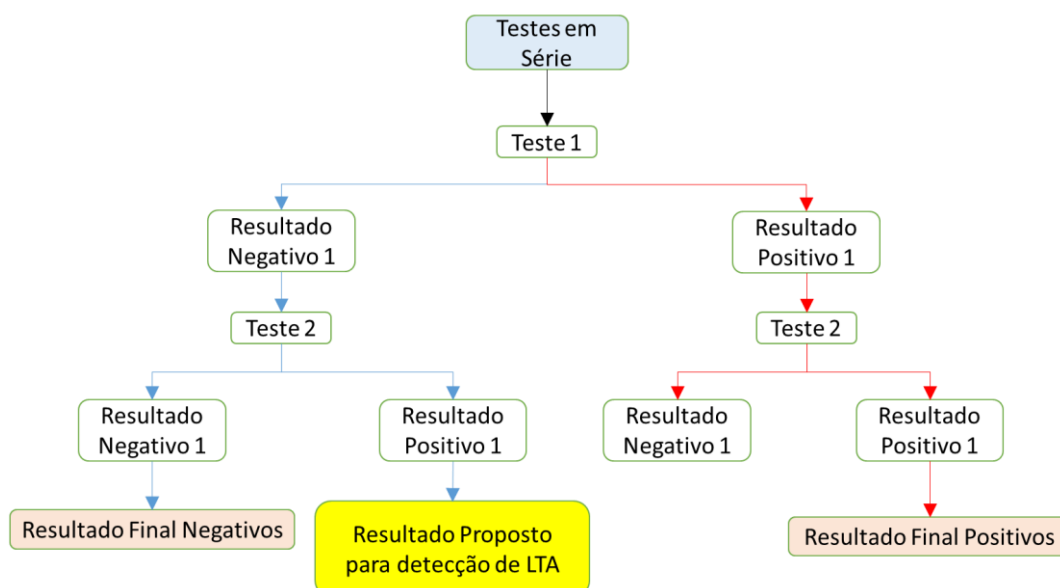


**Figura 5:** Estrutura básica de testes em paralelo

O emprego de testes em série (Figura 6) ocorre sequencialmente, onde o resultado de um teste é usado para filtrar o uso do seguinte. Assim, estes

testes reexaminam os resultados com amostras positivas do teste anterior. O reexame ( $A \cap B$ ) permite investigação e até substituição de um TED (mesmo que padrão, porém caro ou que ofereça riscos) e proporciona evidências para pesquisas. Pode ser parâmetro confirmatório para definir um diagnóstico. Estes testes podem aumentar a especificidade, pois podem reduzir o número de falsos positivos. No entanto, a sensibilidade pode ser reduzida em função do aumento de falsos negativos.

Neste trabalho, propõe-se uma variação dos testes em série, de modo a fazer o reexame não dos resultados positivos, mas sim dos resultados negativos do teste anterior. Desta maneira, seriam considerados positivos a união de resultados positivos dos dois testes ( $A \cup B$ ), assim como ocorre no teste em paralelo. Isto, também permite o aumento da sensibilidade e pode ter como consequência a diminuição da especificidade (de forma similar ao teste em paralelo). A grande vantagem é a utilização do teste anterior como filtro, o que pode implicar em redução de custos através no manejo clínico mais racionalizado.



**Figura 6:** Estrutura básica de testes em série e variação proposta em destaque

## 2 JUSTIFICATIVA

Para a Organização Mundial de Saúde (OMS), a leishmaniose configura entre as principais e mais preocupantes doenças negligenciadas (Rosário et al., 2017). Nas Américas, existe um Plano de Ação para leishmanioses previsto no período de 2017-2022 pela Organização Pan-Americana para a Saúde (OPAS), corroborando com as perspectivas de ações imediatas de diagnóstico frente ao cenário atual. A alternativa imediata consiste no uso de métodos já reconhecidos, como, por exemplo, os métodos de diagnóstico mencionados anteriormente. Além da consistência para registros e ações epidemiológicas, identificar precocemente e corretamente a doença pode prevenir complicações clínicas, incapacidades e mutilações. Dentre os países das Américas que reportaram leishmaniose mucosa/mucocutânea, o Brasil possuiu a maior incidência (762 casos registrados em 2016 conforme relatório emitido pela (OPAS / OMS, 2018). Em relação à LC, uma das metas previstas neste plano inclui a redução da mesma no grupo de indivíduos menores de 10 anos (15,5%, ou seja, 7.583 casos em 18 países das Américas, em 2016). As áreas de fronteira expressam grande incidência de leishmanioses (OPAS / OMS, 2018). Acompanhamos nos últimos anos imigrações (exemplos: venezuelanos para o Brasil, mexicanos para os Estados Unidos e africanos para a Europa) decorrentes de fatores de busca por qualidade de vida (fuga da miséria e de guerras em país de origem). Esta realidade reivindica a necessidade da revisão de questões epidemiológicas. Nos dias atuais esta tem sido uma preocupação na Europa e nas Américas do Sul e do Norte (Khamesipour, 2018). A leishmaniose ganha dimensões mundiais e novas espécies podem ser observadas em áreas distantes de sua origem geográfica até então conhecida, consistindo em casos importados (Roberts et al., 2015). A assistência multiprofissional ao indivíduo portador de lesões engloba ações diretas (assistência médica, de enfermagem, farmacológica, biomédica, entre outras) e indiretas (como a administração de políticas e recursos em de saúde pública).

O suporte diagnóstico é fator decisivo para conferir a segurança médica na conclusão da hipótese e definição de tratamento das leishmanioses. A inexistência de TEDs que sejam plenamente eficientes configura um grande desafio para LTA. Equívocos e demora para detecção deste parasito contribuem para a manutenção de estados clínicos desfavoráveis e estigmatizantes para os indivíduos doentes, bem como constituem em possíveis fatores de agravamento da patologia. A mera autorresolução da patologia gera exposição de indivíduos doentes ao meio ambiente (facilitando a propagação de infecção de vetores e de novos hospedeiros). Diagnóstico tardio, tratamentos equivocados, bem como o desenvolvimento de resistência às drogas são eventos adversos que poderiam ser minimizados nestas conjunturas citadas e podem ganhar nova gestão em conhecimentos obtidos através de pesquisas sobre o assunto (M. S. Andrade et al., 2015; Cordeiro, 2017; D. K. G. Frade, 2016; C.M. Gomes, Paula, et al., 2014; MS, 2017; Nunes et al., 2015). Outra preocupação concerne aos casos de recidiva da LTA (C. M. Gomes et al., 2015).

A explosão tecnológica ainda não contempla as necessidades atinentes ao diagnóstico e atrasam a decisão clínica para início do tratamento farmacológico (MS, 2017). Este, extremamente restrito e tóxico, já eclode com registros da resistência dos parasitos aos antimoniais pentavalentes, sendo já verificado cerca de 30% de recidiva após tratamento com antimoniais (Aguilar & Rodrigues, 2017; Cordeiro, 2017; L. C. Dias, Dessoy, Guido, Oliva, & Andricopulo, 2013; D. K. G. Frade, 2016).

Assim, aumentar a sensibilidade, a especificidade e a acurácia para o diagnóstico de leishmaniose torna-se relevante para a melhoria da qualidade do diagnóstico diferencial da LTA. Avaliar técnicas complementares pode fomentar evidências que contribuam nesta percepção desejada.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia da IDRM e da PCR em testes múltiplos, realizados nos quadros clínicos compatíveis em comparação a testes de referência no diagnóstico diferencial de LTA.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Descrever as características populacionais relacionadas ao diagnóstico da LTA no Hospital Universitário de Brasília – HUB;
- Avaliar sensibilidade, especificidade e a acurácia dos testes de referência na definição de casos de LTA;
- Verificar a sensibilidade, especificidade e acurácia da IDRM com outros testes e exames para LTA; e
- Avaliar o manejo clínico para o diagnóstico de LTA no cenário atual.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Um diagnóstico de LTA foi definido pela visualização positiva do parasito com esfregaços de pele, cultura ou exame histopatológico. Na ausência dos critérios acima mencionados, um caso positivo de LTA foi definido por um infiltrado inflamatório compatível no exame histopatológico, sem qualquer evidência de outra doença pesquisada por colorações especiais ou PCR associadas a uma cura completa após terapia antimonial pentavalente.

Todos os participantes da pesquisa realizada eram pacientes atendidos no ambulatório de Leishmaniose do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), centro de referência de diagnóstico e tratamento de LTA. Os participantes encontravam-se com quadro clínico compatível de LTA e foram submetidos a investigação para diagnóstico diferencial confirmado pelos exames previstos pelo MS. O período de inclusão e coleta de dados iniciou em janeiro de 2012 até dezembro de 2016. Dados complementares foram obtidos através de pesquisa em prontuário destes participantes até o mês de dezembro de 2017.

O grupo estudado, formado por pacientes que cumpriam a definição de caso de LTA, foi denominado de G<sub>1</sub>, sendo constituído por 79 participantes. O grupo controle, formado por pacientes sem LTA, foi denominado G<sub>2</sub> e incluiu outros 20 diferentes participantes. Todos foram submetidos ao diagnóstico diferencial conforme previsto pelo serviço supracitado. A amostra total foi de 99 participantes.

O estudo selecionado para este trabalho a fim de permitir a avaliação da acurácia da IDRM realizada em casos suspeitos de LTA foi o transversal analítico. A amostra, de conveniência, trata-se de parte dos dados obtidos numa coorte histórica iniciada em 1992 pelos pesquisadores da UNB no HUB e que atuam no serviço de dermatologia. Tanto os participantes do grupo controle (G<sub>2</sub>) quanto do grupo de estudado (G<sub>1</sub>) receberam e aceitaram o

convite para integrarem esta pesquisa, conforme previsto junto ao Comitê de Ética em Pesquisa Clínica.

Independente de critérios de inclusão ou exclusão para participar da pesquisa a todos os indivíduos com suspeita de LTA são oferecidos, pelo serviço de dermatologia, a chamada rotina para definição do diagnóstico. Os procedimentos incluem testes em paralelo, quais sejam: Exame clínico e epidemiológico, a imunofluorescência indireta (IFI), a Intradermorreação de Montenegro (IDRM: não realizada desde 2017), a cultura para LTA; o imprint em lâmina de microscopia, o exame histopatológico e a PCR. Os exames foram realizados por técnicos responsáveis, que não tinham conhecimento da real condição dos participantes nem do grupo controle (G<sub>2</sub>) nem do grupo estudado (G<sub>1</sub>). Os exames foram realizados no Laboratório de Dermatologia da Faculdade de Medicina da UnB e no Laboratório Central de Brasília (LACEN-DF, este apenas para a IFI). Os referidos exames foram utilizados conforme a descrição abaixo para a definição de caso (padrão composto de referência) e para avaliação do teste índice, quais foram PCR e IDRM (os procedimentos foram adaptados de:(C.M. Gomes, 2014; C.M. Gomes, Paula, et al., 2014).

Apesar da rotina desencadear o uso de testes em paralelo (simultâneos) como procedimento diagnóstico (em conformidade com a clínica e com a legislação em vigor), aqui nesta pesquisa buscou-se um diferencial de manejo clínico que atendesse às necessidades constantemente observadas em confronto a realidade que estava sendo concretizada. Destarte, após analisar a estrutura dos testes visualizou-se o uso alternativo do teste em paralelo, aplicando-se o segundo teste índice (IDRM) em série (sequenciamento) aos participantes identificados negativamente para o primeiro teste índice (PCR). Enquanto os testes em paralelo conferem maior rapidez no diagnóstico, o teste em série considera o resultado de um teste anteriormente realizado. Aqui o foco principal consiste na observação de resultados negativos em PCR para suspeita de LTA. Através deste sequenciamento um filtro qualifica os TED e vislumbra uma redução de custos



através do manejo com uso racional da IDRM. Os resultados de ambas as estratégias (teste em paralelo e teste em série com a variação proposta) são idênticos nesta pesquisa, conferindo qualificação a esta forma de se delinear nossas perspectivas para este manejo clínico dos TED existentes nos dias atuais para definição diagnóstica de LTA.

#### **4.1 Padrão de referência composto (definição de LTA)**

Os exames utilizados para definição de diagnóstico de LTA (padrão de referência composto) foram a imunofluorescência indireta (IFI), o *imprint* em lâmina de microscopia, a cultura de leishmanias, o exame histopatológico e PCR convencional associada a leitura da sequência do leishmania através da eletroforese.

Uma suspeita de LTA foi confirmada pela visualização positiva do parasito nos esfregaços de pele, na cultura ou no exame histopatológico. Na ausência deste critério supracitado, um diagnóstico de LTA foi definido pela presença de um infiltrado (granuloma infiltrado ou linfo-histio-plasmocitário) compatível com LTA no exame histopatológico, sem qualquer evidência de outra doença pesquisada por colorações especiais ou PCR associadas a uma cura completa após terapia antimonial pentavalente.

#### **4.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos indivíduos que não realizaram os exames de PCR ou a IDRM, grávidas, indivíduos menores de 18 anos e indivíduos que não concordaram com o constante no termo de consentimento livre e esclarecido.

Os critérios de inclusão foram: Termo de Consentimento Livre e Assistido assinado voluntariamente, não grávidas, não gestantes, não incapaz juridicamente, maior de idade, com suspeita de LTA e em acompanhamento clínico no local destinado para coleta das amostras.

### **4.3 Imunofluorescência indireta**

Após punção venosa cubital, o plasma foi separado por centrifugação. O material foi enviado ao LACEN-DF e adicionado a cepas de *Leishmania* fixadas em lâmina (MHOM/BR/PH8 de *L. amazonensis*. Após adição de 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 reação foi visualizada. A leitura da imunofluorescência foi realizada em fotomicroscópio com lâmpada tipo HB200 e filtro BG12 (Axiolab RE, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha). O exame foi considerado positivo em titulações iguais ou superiores a 1:40.

### **4.4 Imprint em lâmina para microscopia**

O participante foi acomodado em decúbito dorsal em sala específica para pequenas cirurgias da pele no HUB. Após adequada assepsia e antisepsia e anestesia local com lidocaína a 2%, foi realizada biópsia incisional circular com diâmetro de 4mm foi realizada com *punch*. O mesmo fragmento foi dividido e utilizado para exame histopatológico e PCR. O fragmento foi pressionado contra 2 lâminas para microscopia em 6 pontos diferentes para cada lâmina. O *imprint* foi fixado por metanol e corado pelo Giemsa conforme anteriormente descrito (SOARES, 2011). A positividade do exame deu-se pela visualização de formas amastigotas em microscópio óptico.

### **4.5 Exame histopatológico**

O exame histopatológico (EH) foi processado após execução da biópsia incisional. O fragmento foi conservado em 20mls de formol a 10% e

encaminhado ao setor de Anatomia Patológica do HUB. Após inclusão em parafina foram realizados cortes para visualização por microscopia óptica. Utilizou-se as colorações hematoxilina e eosina, Giemsa, Ziehl-Neelsen e Grocott. O teste foi considerado positivo quando constatada a presença de formas amastigotas. Alternativamente, o teste foi considerado compatível quando constatadas alterações cutâneas compatíveis com LTA (granuloma, erosão, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, infiltração linfocitária e infiltração plasmocitária).

#### **4.6 Cultura do aspirado da lesão**

A cultura foi realizada pelo aspirado na borda da lesão. Utilizou-se seringa estéril de 1ml contendo 400µL de solução fisiológica estéril e gentamicina a 0,2%. O conteúdo foi dividido em 2 tubos com 150µL do meio sólido Neal, Novy, Nicolle (NNN). Os meios foram incubados em estufa 24-26°C por 30 dias. A pesquisa de formas promastigotas foi realizada em microscópio invertido (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), diariamente, até 30 dias após inoculação. Após positividade o tubo era imediatamente descartado.

#### **4.7 PCR Convencional**

Foram utilizados iniciadores específicos para as sequências do DNA de *Mycobacterium* sp Tb1 5`-GAGATCGAGCTGGAGGATCC-3` e Tb2 5`-AGCTGCAGCCCAAAGGTGTT -3` (Ultrachem, Londres, Reino Unido) com fragmento esperado de 383 pares de base (pb) (REDDI; AMIN; KHANDEKAR, 1994). A reação foi realizada em um volume final de 50µl, contendo 28,75µl de H<sub>2</sub>O; 10µl de tampão a 5x; 4µl de MgCl<sub>2</sub> a [25mM], 1µl de dNTP a [10mM] cada base, 0,25µl de Taq DNA polimerase a [5u/µl]/ 0,5µl de cada par de primer a [10µM] e 5µl do DNA extraído da amostra. Os ciclos para amplificação seguiram desnaturação inicial por 5 minutos a 94°C, seguida por 40 ciclos: 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos), 72°C (1 minuto), e

extensão final a 72°C (10 minutos). Toda reação incluiu controle sem DNA e positivo formado por DNA extraído de cultura de *M. tuberculosis*.

## 4.8 Testes Índice

### 4.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações de PCR foram baseadas na amplificação de uma sequência de 120-pb no minicírculo kDNA de *Leishmania spp.*:

5' - (G / C) (G / C) (C / G) CC (A / C) CTAT (A / T)TTACACCCAACCCC-3' e  
5' -GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' (Eurofins MWG Operon®, Huntsville, AL, EUA) (C.M. Gomes, de Paula, Cesetti, Roselino, & Sampaio, 2014).

As reações foram realizadas em um termociclador Mastercycler® Pro (Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) em um volume final de 25 µL, contendo 1x tampão de PCR, 0,2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCL<sub>2</sub>, 0.5 µM de cada primer, 2.0 unidades DNA polimerase Taq (Invitrogen, Foster City, EUA) e 5 µL de modelo de DNA.

Os ciclos de amplificação incluíram um passo de desnaturação inicial de 3 minutos e 30 segundos a 94 °C, seguido de 35 ciclos a 93 °C (30 segundos), 60 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto), uma extensão final a 72 °C (10 minutos) e incubação a 4 °C. Todas as reações incluíram controle negativo e positivo com lisados de cultura de *L. braziliensis*. Dois microlitros do produto amplificado foram misturados com 2 µL de uma preparação de xileno-cianol (Vetec®, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) e 1 µL (1: 100) de GelRed™ (Biotium®, Havard, CA, EUA) e depois carregados num gel de agarose a 2% imerso em 1x Tris base, ácido acético e tampão de ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA). Utilizou-se um marcador de 100-pb (Invitrogen®, São Paulo, Brasil). A eletroforese foi realizada em um tanque horizontal Sub-Cell® GT Cell 170-4403 (BIO-RAD®, Hercules, CA, EUA) por 1 hora e 30 minutos a 90 V e 400 mAmp. O gel foi visualizado em um sistema de imagens EC3(UVP®, Upland, CA, EUA). Posteriormente, 4 microlitros de todas as amostras positivas foram processados. O subgênero foi identificado

utilizando o comprimento do fragmento de restrição (PCR-RFLP) pelas enzimas HaeIII e Bsr1 (New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, EUA) durante a noite a 37 °C e 65 °C, respectivamente. Os fragmentos foram então visualizados usando eletroforese em gel de poliacrilamida (C.M. Gomes, de Paula, et al., 2014). Todas as amostras negativas foram processadas usando iniciadores endógenos C18X, a fim de garantir a extração de DNA como descrito em outras pesquisas (C.M. Gomes, de Paula, et al., 2014).

O PCR convencional pode identificar o subgênero do leishmania.

#### **4.8.2 Reação Intradérmica de Montenegro (IDRM)**

A IDRM foi realizada utilizando um antígeno fornecido pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos - CPPI, Piraquara, Paraná, Brasil. 0,1 ml da solução foi injetado por via intradérmica na superfície anterior do antebraço esquerdo. A solução é composta por fragmentos de *Leishmania Leishmania amazonensis* (linha de referência MHOM / BR / 73 / PH8) na concentração de 40 µg/ml de nitrogênio proteico, 0.005 g / ml de fenol, 0.0098 g / ml de cloreto de sódio e água destilada suficiente para 1 ml.

A técnica utilizada seguiu os padrões estipulados pelo fornecedor, em conformidade a OMS, na sequência prevista, qual seja (CPPI, 2008): preparo, aplicação e leitura do teste. A via de aplicação utilizada foi a face anterior do antebraço, 2 a 3 cm abaixo da dobra do cotovelo (antecubital), injetando-se via intradérmica o antígeno de Montenegro (0,1 ml, seringa tuberculínica ou intradérmica) até elevação ou pápula local de cerca de 1 cm no momento da inoculação. A leitura foi realizada 48 horas após a inoculação por meio da técnica da caneta esferográfica, medindo-se a endureção através do uso da mesma régua nas quatro direções deste hemisfério, uma por vez (exercendo pressão moderada de ponto extremo, de 1 a 2 cm, até área central de inoculação que encontrar resistência para avançar, levantando-se neste momento a esferográfica) (CPPI, 2008).

Os resultados destes testes foram considerados positivos (reação positiva) no caso de formação de pápula (nódulo ou ulceração) com diâmetro igual ou superior a 5 mm na leitura da pápula após 48 horas.

#### **4.9 Análise Estatística**

As comparações das variáveis categóricas foram realizadas por meio do teste do qui-quadrado ou por sua versão exata. As variáveis numéricas foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. Os testes foram comparados usando o teste de McNemar. Embora a histopatologia da LTA possa ser apresentada de várias formas, em indivíduos sem a visualização das formas amastigotas, definimos como histopatologia altamente sugestiva a presença de granuloma e infiltrado de células plasmocitárias. A porcentagem de resultados positivos em indivíduos com LTA foi usada para calcular a sensibilidade, e a porcentagem de resultados negativos em indivíduos sem LTA foi usada para calcular a especificidade, e a acurácia foi calculada como a soma dos resultados verdadeiro positivo e verdadeiro negativo dividido pelo número total de participantes testados (Quadro 2).

Análise multivariada foi realizada por meio de regressão logística binária com o objetivo de testar possíveis preditores da positividade dos testes índices PCR e IDRM, além da classificação proposta pelo padrão composto de referência. Foram incluídas variáveis que apresentassem valor de p inferior a 0,1 quando confrontadas com os testes índices. Variáveis que pudessem ter algum tipo de relação/dependência foram excluídas.

Valores ausentes foram ignorados em testes não pareados. Utilizou-se para o cálculo estatístico o programa RStudio version 1.1.456 (RStudio Team (2016). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>). A significância estatística foi definida como um valor de p inferior a 0,05 e o IC foi estabelecido em 95%.

#### **4.10 Aspectos éticos**

Os participantes foram esclarecidos sobre a pesquisa e incluídos após concordar e assinar um termo de consentimento por escrito. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB) sob o número de protocolo 37190914.0.0000.5558.

## 5 RESULTADOS

Noventa e nove participantes com suspeita de LTA foram incluídos neste estudo, sendo 79 do grupo de estudo (G<sub>1</sub>) LTA (6 destes com leishmaniose mucosa) e 20 outros alocados no grupo controle (G<sub>2</sub>). A amostra total contou com 99 participantes. A técnica de PCR identifica infecção pelo subgênero.

A Tabela 1 apresenta as características dos grupos, correspondentes ao perfil típico (MS, 2017), que foram avaliados no Hospital Universitário de Brasília. As características consideradas foram: sexo (masculino ou feminino), idade, local da lesão, diâmetro da lesão e tempo da doença.

O grupo de estudo (G<sub>1</sub>) integra 62% de participantes do sexo masculino, e 38% feminino. A mediana de idade, em anos, do grupo de estudo foi de 21 anos e a do controle, 31 anos. Entre os sítios das lesões o maior número de lesões foi identificado principalmente nos membros inferiores (48,1%), cabeça (19%) e membros superiores (15,2%). Identificou-se que 10,1% apresentavam lesões múltiplas. A mediana do diâmetro encontrado foi de 3 cm e a mediana do tempo de doença foi de 3 meses do surgimento dos sintomas. O valor de  $p > 0,005$  indicam que não há diferenças significativas entre os grupos G<sub>1</sub> (estudo) e G<sub>2</sub> (controle) para as características consideradas.



**Tabela 1:** Características principais dos participantes estudados (G<sub>1</sub>) e controle (G<sub>2</sub>) com leishmaniose tegumentar americana.

	G <sub>1</sub> (n = 79)	G <sub>2</sub> (n = 20)	p-value
Sexo			0,508
Masculino, n (%)	49(62,0)	14(70,0)	
Feminino, n (%)	30(38,0)	6(30,0)	
Idade, mediana (IIQ)	48(21)	35(31)	0,278
Lesão, sítio:			0,066
Cabeça, n (%)	15(19,0)	5(25,0)	
Tronco, n (%)	6(7,6)	1(5,0)	
Membros superiores, n (%)	12(15,2)	8(40,0)	
Membros inferiores, n (%)	38(48,1)	6(30,0)	
Múltiplas, n (%)	8(10,1)	0(0,0)	
Diâmetro (cm), mediana (IIQ)	3,0(2,0)	4,0(3,0)	0,625
Tempo da doença (meses), mediana (IIQ)	3,0(4,0)	2(2,0)	0,516

Legenda: LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana, N = Número, IIQ = Intervalo Interquartilício.

G<sub>1</sub> = Grupo de estudo e G<sub>2</sub> = Grupo controle

A Tabela 2 apresenta a sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes utilizados na classificação dos participantes e que formaram o padrão composto de referência. Quanto aos testes histopatológicos dois aspectos foram caracterizados como resultados positivos: presença de formas amastigotas e o critério de compatibilidade. O critério de presença de amastigotas apresentou 100% de especificidade, mas a menor sensibilidade

entre todos os resultados obtidos (27,85%), totalizando acurácia de 42,42%. Com relação ao critério de compatibilidade, a sensibilidade foi de 88,61% e a especificidade foi de 50%, resultando numa boa acurácia (80,81%).

**Tabela 2:** Acurácia diagnóstica dos testes utilizados para classificação de LTA (padrão composto de referência)

		Sensibilidade (G <sub>1</sub> = 79) (IC 95%)	Especificidade (G <sub>2</sub> = 20) (IC95%)	Acurácia (S+E/N) (IC 95%)
Histopatológico critério amastigotas	com formas	27,85% - 22/79 (18,35-39,07)	100% - 20/20 (83,16-100)	42,42% (32,55-52,77)
Histopatológico critério compatibilidade	com	88,61% - 70/79 (79,47-94,66)	50,00% - 10/20 (27,20-72,80)	80,81% (71,66-88,03)
Imprint em lâmina para microscopia		50,63% - 40/79 (39,14-62,08)	100% - 20/20 (83,16-100)	60,61% (50,28-70,28)
Cultura		46,84% - 37/79 (35,51-58,40)	100% - 20/20 (83,16-100%)	57,58% (47,23-67,45)
Imunofluorescência indireta		69,62% - 55/79 (58,25-79,47)	80,00% - 16/20 (56,34-94,27)	71,72% (61,78-80,32)

Legenda: G<sub>1</sub> = Grupo de estudo e G<sub>2</sub> = Grupo Controle e LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana  
S = sensibilidade, E = especificidade e N = total de participantes

O *imprint* em lâmina para microscopia expressou boa especificidade (100%), baixa sensibilidade (50,63%) e acurácia (60,61%). A mesma perspectiva foi encontrada para cultura do parasito: boa especificidade (100%), baixa sensibilidade (46,84%) e acurácia (57,58%). A

Imunofluorescência Indireta (IFI) apresentou resultados moderados distribuídos entre para os três eventos: 69,62% de sensibilidade, 80% para especificidade e 71,72% de acurácia.

Os resultados para PCR, IDRM e combinações de PCR, IDRM (testes índices) são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Acurácia dos testes PCR, IDRM e IDRM aplicado em série para os resultados positivos e negativos de PCR no G<sub>1</sub> e no G<sub>2</sub>.

	Sensibilidade (G <sub>1</sub> = 79) (IC 95%)	Especificidade (G <sub>2</sub> = 20) (IC 95%)	Acurácia (G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> ) (IC 95%)
PCR, total da amostra	74,68% - 59/79 (64,11-82,97)	100% - 20/20 (83,89-100)	79,8% (70,85-86,52)
IDRM, total da amostra	82,28% - 65/79 (72,42-89,14)	60% - 12/20 (38,66-78,12)	77,78% (68,64-84,84)
IDRM aplicado a PCR (+)	79,66% - 47/59 (67,73-87,96)	60% - 12/20 (38,66-78,12)	74,68% (64,11-82,97)
IDRM aplicado a PCR (-)	90,0% - 18/20 (69,90-97,21)	60% - 12/20 (38,66-78,12)	75,0% (59,81-85,81)

Legenda: LTA = Leishmaniose Tegumentar Americana, IDRM = Intradermorreação de Montenegro, G<sub>1</sub> = Grupo de estudo e G<sub>2</sub> = Grupo controle. IC = Intervalo de Confiança,

Os valores obtidos nos testes de PCR realizados para a população total foram de 74,68% para sensibilidade (IC 95% = 64,11-82,97), 100% de especificidade (IC 95% = 83,89-100) resultando num valor de acurácia diagnóstica de 79,8% (IC 95% = 70,85-86,52). Isto indica que o teste de PCR

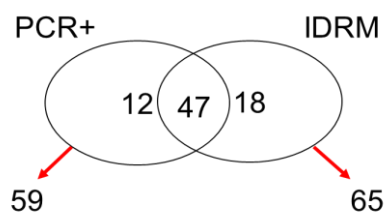
não gerou falsos positivos, ou seja, identificou corretamente todos os participantes sem leishmaniose (grupo de controle). Entretanto, ele gerou falsos negativos, não identificando todos os participantes com leishmaniose.

Também na população total, o uso do teste IDRМ resultou em 82,28% de sensibilidade (IC95% = 72,42-89,14), especificidade de 60% (IC95% = 38,66-78,12) e acurácia de 77,78% (IC95% = 68,64%-84,84). Neste caso, houve geração de falsos positivos e falsos negativos.

Na análise em série, a IDRМ aplicada aos participantes com PCR positivo resultou em uma sensibilidade de 79,66% (IC 95% = 67,73-87,96) e uma acurácia 74,68% (IC 95% = 64,11-82,97). Já nos participantes com teste de PCR negativo do G<sub>1</sub>, a IDRМ em série gerou uma sensibilidade de 90,0% (95% IC = 69,90-97,21). A especificidade para o G<sub>2</sub> manteve-se equivalente a 60% (IC95% = 38,66-78,12) e a acurácia destes resultados foi de 75% (IC95% = 59,81-85,81).

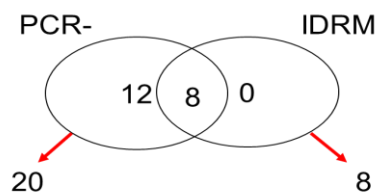
Para uma visão geral dos resultados dos dois grupos, pode-se distribuir os participantes de acordo com os resultados dos testes.

A Figura 7 apresenta a distribuição dos participantes do G<sub>1</sub> em função dos resultados dos testes. É possível notar 59 participantes foram identificados corretamente como doentes pelo PCR+ e 65 foram identificados corretamente como doentes pelo IDRМ, sendo que 47 participantes foram identificados simultaneamente pelos dois testes. Entretanto, 12 foram identificados somente pelo PCR+ e 18 somente pelo IDRМ. Assim, o total de participantes do G<sub>1</sub> identificados corretamente como doentes foi de 77 (12+47+18). Como o total de participantes doentes do G<sub>1</sub> foi de 79, obtivemos 02 que não foram identificados corretamente por nenhum dos testes.



**Figura 7:** Distribuição dos participantes do G<sub>1</sub> pelos testes.

A Figura 8 apresenta a distribuição dos participantes do G<sub>2</sub> em função dos resultados dos testes. É possível notar que 20 participantes tiveram PCR-, ou seja, foram identificados corretamente como não doentes. Porém, destes, 8 foram identificados incorretamente como doentes pelo IDRM. O total de participantes do G<sub>2</sub> foi de 20 participantes.



**Figura 8:** Distribuição dos participantes do G<sub>2</sub> pelos testes.

Com base nas distribuições apresentadas anteriormente tornou-se viável a construção da Tabela 4. Os valores de sensibilidade, especificidade e acurácia foram considerando nos dois testes aplicados em paralelo (os resultados positivos correspondem a união dos resultados positivos dos dois testes), como apresentado na Figura 5. Entretanto, estes resultados coincidem com uma variação da abordagem em série, onde os pacientes com resultados negativos são submetidos a um outro teste em série. Os resultados positivos deste teste são utilizados juntamente com os resultados positivos do teste anterior para identificar o total de resultados positivos. Esta variação é apresentada em destaque na Figura 6.

**Tabela 4:** Distribuições dos participantes pelos resultados dos testes

Resultado dos Testes	Doentes (n)	Não Doentes (n)	Total (n)
Positivo	77	8	85
Negativo	2	12	14
Total	79	20	99

Em ambos os cenários, os testes em paralelo ou em série com a variação proposta, a sensibilidade foi de  $77/79 = 97,47\%$ , que corresponde a um aumento da sensibilidade da PCR usada isoladamente (74,68%). A especificidade do teste IDRM em série aplicada ao PCR com resultado negativo do grupo controle foi de  $12/20 = 60\%$ , o que representa uma redução em relação ao uso isolado da PCR. A acurácia para o total de participantes dos dois grupos foi de  $(77 + 12)/99 = 89,90\%$ , maior que a do teste PCR aplicado isoladamente (79,8%) (Tabela 4).

Para análise multivariada, seguindo a análise dos dados obtidos na pesquisa, foi realizada a comparação entre as variáveis que teriam possível influência no resultado da IDRM e da PCR (testes índices). Observou-se diferença significativa na análise univariada do local da lesão para o valor de PCR e do grupo de participantes (grupo LTA ou controles), tanto para IDRM quanto para PCR, apresentados na Tabela 5. Os resultados que indicam esta diferença revelam valores de  $p < 0,005$ .

Antes da aplicação do modelo de regressão logística, a variável localização da lesão foi desmembrada, pois a mesma apresentava variabilidade grande por diferentes classificações (localização na cabeça, tronco, membros superiores e membros inferiores). Observou-se que a ocorrência de lesões na cabeça ( $p < 0,001$ ) e nos membros inferiores ( $p = 0,013$ ) obteve frequência significativamente maior do que as outras localizações, em comparação ao resultado de PCR. Como as duas variáveis são inter-relacionadas, apenas a ocorrência de lesões na cabeça foi incluída no modelo

multivariado, junto com o grupo do participante para observar a influência no resultado de PCR (Tabela 5).

**Tabela 5:** Análise univariada de possíveis preditores dos testes de índice.

	IDRM p-valor	PCR p-valor
Sexo (Masc. e Fem.)	0,9828	0,384
<b>Local da lesão</b>	0,869	<0,001
<b>Grupo (G<sub>1</sub> x G<sub>2</sub>)</b>	<0,001	<0,001
Idade	0,629	0,379
Tempo de evolução em anos	0,385	0,143
Diâmetro da lesão	0,794	0,537
Número das lesões	0,982	0,437

**Tabela 6:** P-valores relacionados a PCR positivo considerando o local da lesão

	p-valor
Todos os participantes, sem lesão na cabeça (Cabeça Não)	<0,001
Todos os participantes (G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> )	0,988

Na Tabela 6, apenas a localização da lesão sugeriu influência significativa no resultado da PCR. No caso 64% (46/71) dos participantes sem lesões na cabeça apresentaram PCR positivo e apenas 25% dos participantes com lesões na cabeça apresentaram PCR positivo (5/20) ( $p < 0,001$ ). É importante ressaltar que 15,38% (2/13) dos participantes com lesão na cabeça e que apenas 6,06% (4/66) dos participantes com lesões em outras localidades apresentaram a forma mucocutânea da doença, forma esta considerada mais imunogênica e com menor positividade dos exames de PCR.

## 6 DISCUSSÃO

O diagnóstico específico da LTA é uma tarefa essencial e repleta de desafios. O tratamento está frequentemente associado as implícitas reações adversas, independentemente da eficácia encontrada por meio da redução de dose do fármaco correspondente (Kurizky, Mota, & Gomes, 2018; Oyama et al., 2018; Teixeira, 2017). Efeitos indesejáveis relacionados aos antimoniais incluem: alterações cardíacas, hepáticas, pancreáticas e renais. O medicamento também é capaz de atravessar a barreira placentária, promovendo risco de teratogenicidade e embriotoxicidade (Lima et al., 2010; MS, 2017). Assim, o monitoramento dos indivíduos durante o tratamento deve ser constante (Oyama et al., 2018), pois os mecanismos de ação destas drogas ainda continuam pouco compreendidos (Rath et al., 2003).

Outro aspecto consta do dilema médico na tomada de decisão pautada em evidências científicas para evitar uso desnecessário em não doentes e, ainda assim, não deixar de tratar quem realmente está doente. Dentro deste prisma outras características devem ser consideradas, como a visão do patologista, do pesquisador, de outros profissionais e gestores de saúde.

O profissional necessita oferecer uma proposta efetiva de tratamento buscando reduzir malefícios (princípio da beneficência) ou iatrogenias (Garbin et al., 2017; Madalosso, 2000; F. de M. Tavares, 2007). Para tomar uma decisão assertiva é necessário que haja um diagnóstico que forneça as evidências necessárias para delinear suas condutas terapêuticas. As constantes indagações sobre qual TED poderia contemplar o universo de casos que escapam da captura diagnóstica molecular para o *Leishmania* levaram ao reestudo do comportamento dos TED de referência e, em específico, verificar a acurácia da IDRM realizada em série para resultados negativos da PCR. Assim, este trabalho realizou um experimento utilizando a IDRM combinada à PCR buscando identificar possíveis melhorias aos resultados de diagnóstico para LTA.



Os participantes incluídos não demonstraram diferença entre os grupos, apresentando características equivalentes ao perfil da população acometida pela LTA no Brasil Tabela 1 (MS, 2017) Por não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos infere-se um maior grau de confiança nos dados obtidos para esta pesquisa.

Nesta pesquisa, os desafios infringidos ultrapassaram aos impostos pelo parasito em si. A suspensão da produção e distribuição do composto para a realização do Teste de Montenegro determinou fatores limitantes de dados coletados. Contudo, muitos PCR com resultado negativo foram identificados entre casos crônicos e de piores apresentações clínicas, recidivas, tendências de respostas imunológicas mais graves e espécies mais patogênicas do leishmania. A inexistência de um TED padrão-ouro estimulou, dentre as perspectivas alinhadas entre as experiências pretéritas com as da presente realidade, cogitar a hipótese de meios de aprimoramento dos métodos desenvolvidos e conhecidos até então. Dentro da rotina que nos remete a possibilidade do uso de testes em paralelo se, em vez de se aplicar o segundo teste em série (IDRM) aos indivíduos identificados positivamente por PCR, elaborar o segundo teste (IDRM) aos identificados negativamente para LTA, o quanto poderíamos agregar de detecção da doença?

Os dados logrados nesta pesquisa contemplaram alguns métodos para a avaliação da sensibilidade (S), especificidade (E) e acurácia (A) através do padrão composto de referência, quais sejam: a histopatologia, a microscopia, a cultura e a IFI (Tabela 2). Entre os testes histopatológicos o critério de presença de formas amastigotas denota a natureza discrepante desta parasitemia, cuja acurácia total (42,42%) é comprometida pela baixa sensibilidade (27,85%). Num grau menor, pode se considerar que o equivalente também ocorreu para a microscopia do *imprint* da lesão (S = 50,63%, E = 100% e A = 60,61%) e para a cultura (S = 46,84%, E = 100% e A = 57,58%). Vale destacar o custo e o tempo para realizar a cultura como fator desvantajoso desta ferramenta.

A grande limitação dos métodos parasitológicos está basicamente relacionada à necessidade da visualização das formas ou promastigostas. Embora não tenha sido objetivo nesta pesquisa, encontramos na literatura referências que o encontro do parasito é inversamente proporcional ao de duração da lesão (MS, 2017). Fato este intrinsecamente relacionados à clínica de patologias mais graves como a LM (maior tempo de evolução). A dificuldade de um diagnóstico precoce no Brasil cria um adicional inegavelmente perturbador a este TED (B. B. Andrade, Boaventura, Barral-Netto, & Barral, 2005; Cerutti, Lopes, Filho, & Guedes, 2017)

Outrossim, sobre o teste histopatológico o critério de compatibilidade obteve valores de sensibilidade (88,61%), especificidade (50%) e acurácia (80,81%). O aumento da sensibilidade refletiu na acurácia, mas a especificidade reduziu à metade (Tabela 2). Compreende-se que entre os dois critérios utilizados para avaliação do exame histopatológico para esta pesquisa, o critério de compatibilidade ofereceu maior chance de identificação diagnóstica entre os métodos utilizados como padrão composto de referência.

Vale destacar que o critério de compatibilidade depende do bom preparo e da experiência do patologista referentes à doença pesquisada. A realidade no centro de referência para LTA do HUB oferece técnicos preparados e especializados neste local que é tradicionalmente objeto de estudo de gerações de patologistas no HUB / UnB. A busca de materiais para esta pesquisa expressou este diferencial que não se aplica à maioria dos serviços de patologia.

A Imunofluorescência Indireta (IFI, Tabela 2) oferece controvérsias entre clínicos e pesquisadores nas literaturas consultadas (Cerutti et al., 2017). Nesta pesquisa, os resultados da IFI foram razoáveis (S = 69,62%, E = 80% e A = 71,72%). Alguns autores (Pedral-Sampaio et al., 2016) identificaram diferenças de desempenho de acurácia também em relação ao antígeno utilizado para esta técnica, com baixa sensibilidade para a *L. amazonensis* (56,7%) em relação à *L. braziliensis* (91,7%). Testes imunológicos como este são mais utilizados na prática clínica com a finalidade

de, após o término do tratamento proposto, verificar a queda da quantidade de anticorpos relacionados a leishmaniose para equivalência de acompanhamento e parâmetro de cura ao longo de (cerca de cinco) anos de acompanhamento.

A forma clínica da leishmaniose está diretamente relacionada com os títulos de anticorpos no sangue, podendo estar baixo e até ser indetectável para LC sem complicações adjacentes (MS, 2017). Muitos testes sorológicos possuem resultados diversificados entre si, com diferença entre os desempenhos dos testes frente a espécie a ser avaliada. O risco de reação cruzada com infecções por outros protozoários da família tripanossoma é um fator complicador reconhecido, por exemplo, com o *T. Cruzi*. Esta reatividade cruzada tem sido encontrada tanto para tripanossomatídeos quanto para alguns tipos de fungos. Pesquisadores citam como uma das limitações da IFI o fato de ela não relacionar os níveis de anticorpos circulantes com o estadiamento da doença. Em geral, as publicações apresentam uma média de sensibilidade e especificidade com valores variáveis entre os diversos métodos sorológicos disponíveis (Cerutti et al., 2017; de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Luciano, Lucheis, Troncarelli, Luciano, & Langoni, 2009; Pedral-Sampaio et al., 2016). Para outros pesquisadores, além dos procedimentos imunológicos possuírem limitações quanto a uma interpretação incorreta induzida por reações cruzadas (espécies filogênicas relacionadas), pode haver perda de precisão em casos, por exemplo, de pessoas imunodeprimidas (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015).

Já para PCR, uma das razões mais prováveis de resultados negativos tem sido correlacionada a presença de uma resposta imunológica intensa (Gollob, Viana, & Dutra, 2014). Nestes casos, deve-se avaliar os métodos que comunguem desta busca a fim de se criar meios que, até que seja desenvolvido um diagnóstico padrão-ouro, possam atender ao que escapa da percepção dos métodos atuais (Junges, 2005). Recorrer a estratégias complementares pode ser útil para minimizar incertezas.

O profissional médico deve elencar critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais diversos conforme a necessidade de suporte diagnóstico apresentado (C. A. P. Tavares, Fernandes, & Melo, 2003). Para isto, utilizam como referência os critérios definidos pela saúde pública para manejo da LTA (MS, 2017). Saber quando empregar qual método otimiza o processo para a maioria dos casos típicos. Aos casos atípicos a condução clínica pode se tornar singular. Em geral, a visão de cada profissional é isolada (patologista, pesquisador, outros) e será consolidada pelo profissional médico como desfecho diagnóstico.

O TED mais utilizado para identificação do leishmania hoje no Brasil consiste no PCR. Existem variações desta técnica (Galluzzi et al., 2018), como o q-PCR (PCR quantitativo em tempo real) (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015) e o multiplex (de Cássia-Pires, De Melo, Da Hora Barbosa, & Roque, 2017). O kDNA é amplamente eleito para amplificação do DNA do parasita devido ao grande número de cópias que é viabilizado através deste modelo. A escolha da região alvo a ser visualizada tem sido considerada o ponto-chave para os avanços de tecnologias que utilizem o PCR para fundamentar um diagnóstico (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; C.M. Gomes, 2014; MS, 2017; Taslimi & Rafati, 2018).

Apesar da PCR ser considerada altamente específica (100%, Tabela 3), sua sensibilidade é incompleta (74,68%, Tabela 3). Algumas investigações atribuíram boa acurácia, mas encorajam o estudo do aumento da sensibilidade desta técnica (Ciro Martins Gomes et al., 2015).

Pelo exposto anteriormente, a necessidade de uma nova estratégia deve ser direcionada aos indivíduos que apresentam resultado de PCR negativo (Tabela 3). Uma das principais razões que explicam uma PCR com resultado negativo para casos de LTA são a concomitância de uma forte resposta imune celular e a formação de granuloma (Borges et al., 2003; Daneshbod et al., 2011; Lourenço, 2015). Tais características são frequentemente encontradas em casos crônicos de LTA e na LM, embora possa ocorrer em todas as infecções não causadas por *L. braziliensis*. Esta

reação imunológica pode ser considerada suficiente para interferir no processo infeccioso, por diminuir significativamente a carga parasitária na lesão, repercutindo na redução da sensibilidade aos exames parasitológicos, inclusive no PCR. Lamentavelmente, este processo não é capaz de induzir a cura da doença (Lourenço, 2015; Scott & Novais, 2016). Esta realidade é comumente encontrada na América do Sul, onde a *L. braziliensis* é endêmica. E esta espécie está associada à forma mucosa da leishmaniose e, por vezes, com apresentações clínicas de longa duração, também associadas a baixas cargas parasitárias (C.M. Gomes, Paula, et al., 2014; Teixeira, 2017).

Até a implantação da PCR, a IDRM (reação de hipersensibilidade tardia) consistia em um dos principais exames complementares para o diagnóstico de LTA, inclusive em áreas endêmicas. O desuso do Teste de Montenegro pode ser questionável. Para o uso racional da IDRM alguns critérios devem ser considerados. Entre eles: reações cruzadas em portadores de doença de Chagas ou curados de leishmaniose visceral, resultados falsos negativos em caso de outras infecções, resultado negativo em imunossuprimidos e em indivíduos com a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), resultado positivo em infecção subclínica em áreas endêmicas (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015). Para isto, é fundamental o treinamento do pessoal e o uso de boas práticas tanto para a IDRM quanto para qualquer outra atividade diagnóstica. O custo para emprego deste método pode ser considerado baixo, o que facilita a disponibilidade do mesmo em áreas distantes dos centros de referência.

Para o teste de PCR (isolado) entre todos os participantes (99, Tabela 3) deste estudo, obteve-se S = 74,68%, E = 100% e A = 79,8%. Alguns indivíduos com características sugestivas de LTA (20 de 79, G<sub>1</sub>) obtiveram resultado negativo para PCR. Infere-se que há uma necessidade de melhoria quanto a sensibilidade a fim de se solucionar os resultados falsos negativos encontrados, embora sua especificidade seja ótima. Logo, podemos entender que a sensibilidade da PCR é incompleta para LTA. Destaca-se o fato da quantidade de participantes com resultado negativo de PCR (20 de 79 do G<sub>1</sub>)

ter coincido com o total do outro grupo ( $G_2$ ), porém os indivíduos são diferentes pois são de diferentes grupos.

Ao realizarmos a IDRM (isolada) na população total (99), a correspondência foi de  $S = 82,28\%$ ,  $E = 60\%$  e  $A = 77,78\%$ . Embora a especificidade tenha decrescido (identificando-se 12 de 20 pessoas entre indivíduos do grupo controle), houve progresso do valor da sensibilidade, com maior percepção de casos de LTA entre o  $G_1$  (identificando-se 65 dos 79 do grupo de estudo). A IDRM isolada produz falsos positivos (8 de 20) e falsos negativos (14 de 79).

Na Tabela 3, a IDRM em série e a PCR podem ser relacionadas com a técnica que obteve o melhor resultado no padrão composto de referência (Tabela 2); qual seja o histopatológico por critério de compatibilidade. Este parâmetro de combinações entre testes oferece dinâmicas a serem posteriormente consideradas. Alguns exemplos são apresentados abaixo:

Se avaliarmos PCR + e IDRM para PCR-, sob a ótica da Tabela 3, podemos desenvolver a seguinte conclusão:  $S = 77 / 79$  (97,47%),  $E = 12 / 20$  (60%) e  $A = 77 + 12 / 99$  (89,90%);

Se avaliarmos a IDRM para PCR- e combinarmos com histopatológico compatível, sob a ótica da Tabela 3, chegaremos aos seguintes valores:  $S = 17 / 20$  (85%),  $E = 16 / 20$  (80%) e  $A = 77 + 16 / 99$  (82,5%);

Se avaliarmos PCR + e IDRM para PCR – com histopatológico compatível, sob a ótica da Tabela 3, obteremos:  $S = 76 / 79$  (96,20%),  $E = 16 / 20$  (80%) e  $A = 76 + 16 / 99$  (92,92%).

Dando continuidade às possibilidades elencadas, nas Figura 7 e Figura 8 os resultados foram os mesmos tanto para distribuição de testes em paralelo quanto em série com a variação proposta. Logo o que foi constatado indica que a questão da aplicação do teste em paralelo ou do teste em série com a variação proposta passa a depender da escolha entre um diagnóstico mais rápido e, possivelmente, mais caro, ou um diagnóstico mais demorado para a parcela dos doentes não contemplados efetivamente pelo PCR, porém,

possivelmente, de menor custo (sequenciado e de uso racional, ou seja, em série).

A abordagem proposta de uso dos TED pode reduzir a detecção de falsos negativos, mas pode aumentar o número de falsos positivos. Ou seja, a abordagem pode identificar um maior número de pessoas que realmente devem ser tratadas por estarem doentes, porém pode aumentar o número de pessoas sem LTA que receba tratamento correspondente. Em centros de referência onde a prevalência da doença (aparecimento de pessoas que apresentam a doença), normalmente, é maior, a acurácia tende a ser maior, pois a abordagem proposta possibilita um aumento da sensibilidade, apesar da possível redução da especificidade.

Na IDRM realizada em série, para os participantes com resultado negativo de PCR obteve-se  $S = 90\%$ , valor superior aos encontrados anteriormente. Além disso, obteve-se  $E = 60\%$  e  $A = 75\%$  (Tabela 3).

Na distribuição dos participantes em função dos testes, o resultado foi de  $S = 97,42\%$  (Tabela 4). Neste último cálculo, obteve-se  $A = 89,90\%$ , superior aos demais valores logrados em testes isolados. Os resultados encontrados sugerem que há viabilidade de rever o manejo clínico que está em vigor para diagnóstico de LTA.

A IDRM como teste complementar pode ser útil tendo como vantagens: requerer menos recursos para ser aplicada a ser de fácil aprendizado e execução (a execução do Teste de Montenegro é similaridade ao teste tuberculínico, ou PPD, realizado há décadas) (MS, 2017; Scott & Novais, 2016a; Skraba et al., 2015).

A principal limitação do presente estudo é que, para eliminar vieses, todos os testes foram realizados no mesmo período. Fazemos as recomendações acima mencionadas com base na interpretação em série da IDRM após PCR. No entanto, acreditamos que o desempenho da IDRM somente após um resultado de PCR negativo ser conhecido tende a revelar valores de IDRM ainda maiores, uma vez que a duração da doença é descrita

como positivamente relacionada à resposta celular. Mas o antígeno para o teste de Montenegro é escasso, o que dificulta a continuidade deste estudo.

Em relação à problemática atinente ao controle de qualidade do antígeno utilizado para o Teste de Montenegro, estudos concluíram que o modelo Murino C. Porcellus demonstrou ter forte potencial como modelo in vivo tanto para testes com modelos animais infectados por *L. amazonensis* ou *L. Braziliensis* (Guedes et al., 2017). Esta pesquisa abre novos campos de possibilidades investigativas quanto a acurácia da IDRМ.

A comparação entre as variáveis que teriam possível influência no resultado da IDRМ e da PCR (testes índices, Tabela 5) conferiu valor de  $p < 0,005$ , e indicam a diferença referente ao local da lesão para o valor de PCR e do grupo de participantes, tanto para IDRМ quanto para PCR. Apesar destes dados sugerirem que há mais possibilidade de se obter um resultado correspondente de LTA através de PCR em áreas que não seja a cabeça, não podemos afirmar este fato como definitivo.

A IDRМ é considerada cientificamente uma ferramenta diagnóstica complementar, apesar do seu desuso. Há estudos (Krolewiecki et al., 2017) que consideram alta a correlação dos resultados de esfregaço e a IDRМ e sugerem elaboração de Protocolos para auxiliar no diagnóstico de LTA com o uso da IDRМ. Estes estudos relatam não ser preocupante a exposição ao parasita neste método, mesmo em área endêmica, visando o início do tratamento.

A hipótese para a negatividade da PCR na LTA ativa, como dito, remete a presença de uma forte resposta imunológica celular encontrada especialmente na leishmaniose crônica e na leishmaniose mucocutânea. A reconhecida resposta celular individual indica que testes imunológicos como a IDRМ podem ser convenientes (Scott & Novais, 2016) Isso reforça a utilidade de exames que detectam antígenos de *Leishmania* como a IDRМ em pacientes com teste de PCR negativo. A associação racional de outros exames, como a histopatologia, também pode ser benéfica.



Grande exemplo é a repetição do teste de Microscopia Óptica (MO) para a detecção de *Tripanossoma Cruzi*, minimizando a má mensuração deste parasito quanto a vigilância relacionada à doença de Chagas (Minuzzi-Souza et al., 2018). Mas, para a identificação do parasito *Leishmania*, esta técnica de aprimoramento de microscopista pode ser questionável. Além disto, precisaríamos reavaliar as condições e disponibilidades para este recurso com pessoal experiente e bem treinado.

Algo que se pode questionar sobre o assunto está relacionado ao material utilizado na formulação atual que utiliza o antigênico da *L amazonensis* (Bio-Manguinhos, 2003; CPPI, 2008). Na prática, a dificuldade de se obter o antigênico mais seguro (princípio da beneficência) parece ter se constituído num dos maiores desafios para o emprego da técnica que é de fácil aplicabilidade e baixo custo. Pesquisas para elaboração de antigênicos mais seguros e dentro do que prevê a ANVISA podem ser ou estar sendo desenvolvidas no momento. Dentro deste contexto, no decorrer desta pesquisa não foram encontrados estudos que relacionassem o desenvolvimento de leishmaniose como efeito da aplicação da IDRM ou sequer novas perspectivas plausíveis de aprimoramento deste antigênico.

Novas estratégias têm sido avaliadas para tornar o procedimento diagnóstico da LTA não invasivo, fácil, barato e indolor. Procedimentos invasivos, como a coleta de amostra para biópsia, exigem infraestrutura em conformidade às regulamentações sanitárias e de segurança aos indivíduos. Porém há casos observados com resultados negativos para PCR e com apresentação clínica e epidemiológica sugestiva. Os exames que detectam resposta celular imunológica, associada ou não à histopatologia, são úteis para reduzir a taxa de testes falso-negativos (Adams et al., 2014; Sevilla-Santos et al., 2018; Suárez et al., 2015).

O uso de swabs associado à PCR cria uma nova concepção e tornam o método atrativo e de fácil emprego para coleta de amostra. O uso da PCR multiplex permite detecções simultâneas, reduzindo o tempo de resultado de um diagnóstico (Boni et al., 2017; de Cássia-Pires et al., 2017; Ciro Martins

Gomes et al., 2017; Sevilla-Santos et al., 2018). Novos esforços consistem na associação não invasiva de técnicas e de alterações de uso de métodos. Testam-se o uso do *swab*, o uso do SYBR Green e Taq-Man baseados em tempo real (qPCR) (Ciro Martins Gomes et al., 2017).

A citometria de fluxo está entre as recentes estratégias de métodos sorológicos que podem servir de opções futuras para a detecção da LTA. Em um determinado estudo a sensibilidade encontrada pela citometria de fluxo foi maior em relação a do teste ELISA, embora menos específica (B. C. Oliveira, Mendes, Casiro, & Hernandez, 2016; Pedral-Sampaio et al., 2016). Estas comparações podem delinear novos parâmetros exploratórios significativos para o cenário diagnóstico. A citometria de fluxo ainda não é uma realidade estratégica viável, pelo custo e necessidade de suporte técnico especializado. Alguns autores (Bari & Rahman, 2006) citam que até o recurso básico pode ser considerado pouco acessível em determinadas regiões (Biswas et al., 2018; Saldiva et al., 2018; Taslimi & Rafati, 2018).

## 7 CONCLUSÃO

No caminho de sofismas diagnósticos cujo inaudito parasito leishmania insiste em desafiar o conhecimento contemporâneo a lógica deve ser pautada na quebra dos paradigmas e pensamentos reducionistas para o manejo clínico da LTA.

Com os dados obtidos e analisados nesta pesquisa conclui-se que:

- o TED estipulado e disponível no Brasil (PCR) possui sensibilidade incompleta;
- existe uma parcela significativa de indivíduos com características sugestivas de LTA, mas que apresentam o resultado negativo para PCR;
- exames complementares usados em combinação (testes múltiplos, em paralelo ou em série com a variação proposta neste trabalho) podem agregar informações úteis para o esclarecimento diagnóstico diferencial de LTA;
- a IDRM, apesar de estar em desuso, pode contribuir para detecção de LTA em indivíduos com resultado da PCR negativo (uso racional), demonstrando ser um teste potencialmente sensível e acurado para estas situações;
- a IDRM é uma ferramenta de exame complementar útil e de baixo custo, podendo ser empregada e acessível em regiões mais remotas (distantes de centros de referência) e com menos recursos disponíveis;
- A estratégia de uso combinado da IDRM e da PCR (em paralelo ou em série com a variação proposta neste trabalho) forneceu evidências de ser acurada para atender um maior número de indivíduos com LTA.

Assim, o uso racional da combinação dos TED já desenvolvidos podem ser aprimorado com finalidade de aumento da qualidade do diagnóstico

diferencial desta patologia, agregando valores ao protocolo já existente para manejo clínico. Assim, esta combinação pode fornecer subsídios que irão norteiar a decisão no dilema clínico sobre o uso de fármacos antileishmanicidas.

Frente aos dados obtidos e analisados fomenta-se rever novas perspectivas através do uso racional do teste de Montenegro em série, em especial para indivíduos com resultado de PCR negativo.

Futuros estudos sobre outras técnicas que detectam a resposta celular na LTA podem enriquecer esta vertente de esclarecimentos atinentes ao controle das leishmanioses.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, E. R., Gomez, M. A., Scheske, L., Rios, R., Marquez, R., Cossio, A., ... Saravia, N. G. (2014). Sensitive diagnosis of cutaneous leishmaniasis by lesion swab sampling coupled to qPCR. *Parasitology*, *141*(14), 1891–1897. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001280>
- Adegboye, O., & Adegboye, M. (2017). Spatially Correlated Time Series and Ecological Niche Analysis of Cutaneous Leishmaniasis in Afghanistan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *14*(3), 309. <https://doi.org/10.3390/ijerph14030309>
- Aguiar, P. F., & Rodrigues, R. K. (2017). Leishmaniose visceral no Brasil: artigo de revisão. *Unimontes Científica*, *19*(1), 191–204.
- Altamirano-Enciso, A. J., Marzochi, M. C. A., Moreira, J. S., Schubach, A. O., & Marzochi, K. B. F. (2003). Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, *10*(3), 853–882. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702003000300004>
- Andrade, B. B., Boaventura, V., Barral-Netto, M., & Barral, A. (2005). Métodos Diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: Fatos, Falácias e Perspectivas. *Gazeta Médica da Bahia*, *8*.
- Andrade, M. S., Courtenay, O., F. Brito, M. E., Carvalho, F. G., Carvalho, A. W. S., Soares, F., ... Brandão-Filho, S. P. (2015). Infectiousness of Sylvatic and Synanthropic Small Rodents Implicates a Multi-host Reservoir of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *9*(10), e0004137. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004137>
- Ávila-Pires, F. D. de. (1989). Zoonoses: hospedeiros e reservatórios. *Cadernos de Saúde Pública*, *5*(1), 82–97. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1989000100007>
- Barçante, J. M. P. (2017). Urbanização e Leishmaniose. *Revista pré-univesp*, N<sup>o</sup>.61. Recuperado de <http://pre.univesp.br/urbanizacao-e-leishmaniose#.Ww3lrUgvy01>
- Bari, A. ul, & Rahman, S. ber. (2006). Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. *Indian*

- Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, 72(1), 28.  
<https://doi.org/10.4103/0378-6323.19714>
- Basano, A., & Camargo, L. (2004). *Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle* (Vol. 7).
- Bastos, T. S. A., Linhares, G. F. C., Madrid, D. M. de C., Bastos, T. S. A., Linhares, G. F. C., & Madrid, D. M. de C. (2016). Morphologic identification of Phlebotomine sandflies captured in urban area. *Ciência Animal Brasileira*, 17(3), 395–401. <https://doi.org/10.1590/1089-6891v17i332179>
- Baum, M., Ribeiro, M. C. V. da C., Lorosa, E. S., Damasio, G. A. C., & Castro, E. A. de. (2013). Eclectic feeding behavior of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the transmission area of American cutaneous leishmaniasis, state of Paraná, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 46(5), 560–565. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0157-2013>
- Bio-Manguinhos, F. (2003, junho). Antígeno para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana por Reação Intradérmica de Montenegro. Recuperado de [https://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BMDC\\_O\\_009\\_01bk\\_montenegro\\_leish\\_A4.pdf](https://www.bio.fiocruz.br/images/stories/pdfs/manuais/leishmaniose/BMDC_O_009_01bk_montenegro_leish_A4.pdf)
- Biswas, D., Dolai, S., Chowdhury, J., Roy, P., Grigorieva, E., Biswas, D., ... Grigorieva, E. V. (2018). Cost-Effective Analysis of Control Strategies to Reduce the Prevalence of Cutaneous Leishmaniasis, Based on a Mathematical Model. *Mathematical and Computational Applications*, 23(3), 38. <https://doi.org/10.3390/mca23030038>
- Boni, S. M., Oyafuso, L. K., Soler, R. de C., Lindoso, J. A. L., Boni, S. M., Oyafuso, L. K., ... Lindoso, J. A. L. (2017). Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759038>
- Borges, V. C., Ruiz, M. C. M., Gomes, P. M., Colombo, A. R., Silva, L. de A., Romero, H. D., & Prata, A. (2003). Montenegro intradermoreaction after the test sequential repetitions in Porteirinha, Minas Gerais State, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2), 249–251. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000200009>

- Cerutti, P. H. P., Lopes, C. G., Filho, F. G. L., & Guedes, V. R. (2017). Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. *Revista de Patologia do Tocantins*, 4(4), 55–59. <https://doi.org/10.20873/uft.2446-6492.2017v4n4p55>
- Cordeiro, L. V. (2017). *Correlação entre os parâmetros de virulência e resistência ao antimônio trivalente (SbIII) em isolados clínicos de Leishmania (Viannia) braziliensis*. (Mestrado). UFP, João Pessoa, Paraíba. Recuperado de <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/9398/2/arquivototal.pdf>
- Cota, G. F., Sousa, M. R. de, Fereguetti, T. O., Saleme, P. S., Alvarisa, T. K., & Rabello, A. (2016). The Cure Rate after Placebo or No Therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 11(2), e0149697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149697>
- CPPI, S. de S. do P. (2008, maio 7). Antígeno de Montenegro - Bula. Recuperado de <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CPPI/bulas/montenegro.pdf>
- CRMV-MG. (2012). Leishmaniose Visceral Felina. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, 65, 106–116.
- Cruvinel, W. de M., Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A. P., Catelan, T. T. T., Souza, A. W. S. de, Silva, N. P. da, & Andrade, L. E. C. (2010). Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 50(4), 434–447. <https://doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>
- Daneshbod, Y., Oryan, A., Davarmanesh, M., Shirian, S., Negahban, S., Aledavood, A., ... Daneshbod, K. (2011). Clinical, Histopathologic, and Cytologic Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis and Literature Review. *Arch Pathol Lab Med*, 135, Issue 4. <https://doi.org/10.1043/2010-0069-OA.1>
- de Cássia-Pires, R., De Melo, M. D. F. A. D., Da Hora Barbosa, R., & Roque, A. L. R. (2017). Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. KDNA and the *gapdh* housekeeping gene of mammal hosts. *PLoS ONE*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922>
- de Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C., ... Pereira, V. R. A. (2015). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Bioscience*, 5(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>

- Dias, G. L., Camponogara, S., Costa, V. Z. da, Cezar-Vaz, M. R., Weiller, T. H., & Cardoso, L. S. (2018). Representações sociais sobre saúde e meio ambiente para equipes de Estratégia Saúde da Família. *Saúde e Sociedade*, 27(1), 163–174. <https://doi.org/10.1590/s0104-12902018170658>
- Dias, L. C., Dessoy, M. A., Guido, R. V. C., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2013). Neglected tropical diseases: a new era of challenges and opportunities. *Química Nova*, 36(10), 1552–1556. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013001000011>
- Fagundes, B. G. (2016). *Morfometria alar das espécies do subgênero Lutzomyia (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) que ocorrem no Brasil*. (Mestrado). UnB, Brasília. Recuperado de [http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/21837/1/2016\\_B%C3%A1rbaraGordaniFagundes.pdf](http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/21837/1/2016_B%C3%A1rbaraGordaniFagundes.pdf)
- Falcão, S. A. C. (2013). *Avaliação da interação entre neutrófilos e Leishmania braziliensis* (Doutorado). FIOCRUZ, UFB, Salvador, Bahia. Recuperado de <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7142>
- Ferreira, J. B. C. (2015). *OCORRÊNCIA DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) EM MATAS DE GALERIA NO DISTRITO FEDERAL, BRASIL*. UnB.
- FIOCRUZ. (1997). As Leishmanioses - Morfologia. Recuperado 20 de maio de 2018, de <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>
- Fletcher, R. H., & Fletcher, S. (2005). *Clinical Epidemiology: The Essentials*. (4<sup>o</sup> ed). Philadelphia, Pennsylvania, USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Frade, A. F. (2011). Visceral leishmaniasis and genetic susceptibility. *Revista da Biologia*, 6(2), 22–25. <https://doi.org/10.7594/revbio.6b.05>
- Frade, D. K. G. (2016). *O impacto da resistência ao antimônio trivalente na biologia e resistência à lise pelo complemento em Leishmania (Leishmania)*. (Mestrado). UFP, João Pessoa, Paraíba. Recuperado de <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/9459/2/arquivototal.pdf>
- Furusawa, G. P., & Borges, M. F. (2014). Colaboração para o conhecimento do histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na vila de vassouras - RJ, nos anos de 1820 a 1880. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*, 43(1), 7–25.



- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>
- Garbin, C. A. S., Belila, N. de M., Precinoti, I. B., Miyada, S., Garbin, A. J. Í., & Martins, R. J. (2017). Abordagem multiprofissional no diagnóstico de leishmaniose: um relato de caso. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION*, 6(8). <https://doi.org/10.21270/archi.v6i8.2090>
- Gollob, K. J., Viana, A. G., & Dutra, W. O. (2014). Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunology*, 36(8), 367–376. <https://doi.org/10.1111/pim.12100>
- Gomes, C. M., Cesetti, M. V., de Moraes, O. O., Mendes, M. S. T., Roselino, A. M., & Sampaio, R. N. R. (2015). The influence of treatment on the development of leishmaniasis recidiva cutis: a 17-year case-control study in Midwestern Brazil. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 29(1), 109–114. <https://doi.org/10.1111/jdv.12473>
- Gomes, Ciro Martins, Cesetti, M. V., Paula, N. A. de, Vernal, S., Gupta, G., Sampaio, R. N. R., & Roselino, A. M. (2017). Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where Leishmania (Viannia) braziliensis Is Endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(2), 526–534. <https://doi.org/10.1128/JCM.01954-16>
- Gomes, Ciro Martins, Mazin, S. C., Santos, E. R. dos, Cesetti, M. V., Bächtold, G. A. B., Cordeiro, J. H. de F., ... Sampaio, R. N. R. (2015). Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: systematic literature review and meta-analysis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), 157–165. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140280>
- Gomes, C.M. (2014). *Acurácia da reação em cadeia da polimerase em amostras de saliva, swab nasal e papel filtro oral no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. Estudo clínico, revisão sistemática da literatura e meta-análise.* UnB, Brasília. Recuperado de [file:///C:/Dados/Ana/BCS\\_02/2018/Mestrado\\_UNB/2018\\_UNB/Aa\\_TCC\\_31082018/TCC\\_Referencias%20Bibliograficas/2014\\_Tese\\_CiroMartinsGomes.pdf](file:///C:/Dados/Ana/BCS_02/2018/Mestrado_UNB/2018_UNB/Aa_TCC_31082018/TCC_Referencias%20Bibliograficas/2014_Tese_CiroMartinsGomes.pdf)

- Gomes, C.M., de Paula, N. A., Cesetti, M. V., Roselino, A. M., & Sampaio, R. N. R. (2014). Mucocutaneous leishmaniasis: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis*–endemic area. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 79(4), 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.002>
- Gomes, C.M., Paula, D., Aparecida, N., Morais, O. O., Soares, K. A., Roselino, A. M., ... Sampaio, R. N. R. (2014). Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(5), 701–709. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142389>
- Gordis, L. (2014). *Epidemiology* (15<sup>o</sup> ed). Philadelphia: Elsevier Saunders. Recuperado de [http://sbmu.ac.ir/uploads/epidemiology\\_gordis\\_5\\_edi.pdf](http://sbmu.ac.ir/uploads/epidemiology_gordis_5_edi.pdf)
- Guedes, D. C., Minozzo, J. C., Pasquali, A. K. S., Faulds, C., Soccol, C. R., & Thomaz-Soccol, V. (2017). New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production level. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 50(6), 788–794. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0131-2017>
- Guimarães, M. C. S. (1985, junho). Exames de laboratório: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, 18, 117–120.
- Hemmer, C. J., Emmerich, P., Loebermann, M., Frimmel, S., & Reisinger, E. C. (2018). [Mosquitoes and Ticks: The Influence of Global Warming in the Transmission of Infectious Diseases in Germany]. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 143(23), 1714–1722. <https://doi.org/10.1055/a-0653-6333>
- Junges, J. R. (2005). *Bioética como casuística e como hermenêutica*. Revista Brasileira de Bioética: Bioética: hermenêutica e casuística. Recuperado de [http://www.bioetica.org.br/library/modulos/varias\\_bioeticas/arquivos/Varias\\_Casuistica.pdf](http://www.bioetica.org.br/library/modulos/varias_bioeticas/arquivos/Varias_Casuistica.pdf)
- Kawamura, T. (2002). Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica: eficiência de um teste. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 79(4), 437–441. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2002001300015>
- Khamesipour, A. (2018, novembro 9). Maybe this is the right time to take a step forward and do something about leishmaniasis, says Dr. Ali Khamesipour from Tehran. Recuperado 15 de novembro de 2018, de <http://www.sbmt.org.br/porta/maybe-this-is-the-right-time-to-take-step->

forward-and-do-something-about-leishmaniasis-says-dr-ali-khamesipour-from-tehran/?lang=en

- Krolewiecki, A. J., Almazan, M. C., Quipildor, M., Juarez, M., Gil, J. F., Espinosa, M., ... Cajal, S. P. (2017). Reappraisal of Leishmanin Skin Test (LST) in the management of American Cutaneous Leishmaniasis: A retrospective analysis from a reference center in Argentina. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005980>
- Kurizky, P. S., Mota, L. M. H. da, & Gomes, C. M. (2018). The paradox of tegumentary leishmaniasis diagnosis: How the need for accurate and modern techniques is being addressed in low income areas. *EBioMedicine*, *0*(0). <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.11.011>
- Lainson, R. (2010). Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, *1*(2), 13–32. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>
- Lima, M. I. S., Arruda, V. O., Alves, E. V. C., de Azevedo, A. P. S., Monteiro, S. G., & Pereira, S. R. F. (2010). Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. *Archives of Toxicology*, *84*(3), 227–232. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0485-0>
- Lindsten, J. (1999). *Physiology Or Medicine, 1901-1921*. World Scientific.
- Lourenço, L. S. de A. (2015). *Avaliação da carga parasitária e fatores de virulência em lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana: correlação com a forma clínica e resposta à terapêutica* (Mestrado). FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Recuperado de [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/13513/1/luana\\_lourenco\\_ioc\\_mest\\_2015.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/13513/1/luana_lourenco_ioc_mest_2015.pdf)
- Luciano, R. M., Lucheis, S. B., Troncarelli, M. Z., Luciano, D. M., & Langoni, H. (2009). Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de Leishmania spp e Trypanosoma cruzi na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, *46*(3), 181–187. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26765>

- Madalosso, A. R. M. (2000). Nursing iatrogenic care: dialoguing with danger in professional quotidian. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 8(3), 11–17. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692000000300003>
- Magalhães, A. V. de, Moraes, M. A. P., Raick, A. N., Llanos-Cuentas, A., Costa, J. M. L., Cuba, C. C., & Marsden, P. D. (1986). Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28(4), 253–262. <https://doi.org/10.1590/S0036-46651986000400008>
- Marassa, A. M., Galati, E. A. B., Bergamaschi, D. P., Consales, C. A., Marassa, A. M., Galati, E. A. B., ... Consales, C. A. (2013). Blood feeding patterns of *Nyssomyia intermedia* and *Nyssomyia neivai* (Diptera, Psychodidae) in a cutaneous leishmaniasis endemic area of the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(5), 547–554. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0168-2013>
- Medronho, R. A., Bloch, K. V., Luiz, R. R., & Wernwck, G. L. (2008). *Epidemiologia*. (2ª). São Paulo.: Atheneu.
- Mendes, C. S., Coelho, A. B., Féres, J. G., Souza, E. C. de, Cunha, D. A. da, Mendes, C. S., ... Cunha, D. A. da. (2016). The impact of climate change on leishmaniasis in Brazil. *Ciência & Saúde Coletiva*, 21(1), 263–272. <https://doi.org/10.1590/1413-81232015211.03992015>
- Mendes, T. A. de O. (2015). *Genômica evolutiva e o estudo de mecanismos de adaptação do metabolismo de Leishmania ao parasitismo intracelular* (Doutorado). UFMG, Belo Horizonte, Minas Gerais. Recuperado de <http://www.pgbioinfo.icb.ufmg.br/defesas/74D.PDF>
- Minuzzi-Souza, T. T. C., Nitz, N., Cuba, C. A. C., Hagström, L., Hecht, M. M., Santana, C., ... Gurgel-Gonçalves, R. (2018). Surveillance of vector-borne pathogens under imperfect detection: lessons from Chagas disease risk (mis)measurement. *Scientific Reports*, 8(1), 151. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18532-2>
- MS. Doenças Infecciosas e Parasitárias: Guia de bolso (2010).
- MS. (2017). *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar*. Brasília.
- MS, A. RDC n. 63 - Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Saúde, Pub. L. No. RDC 63 (2011). Recuperado de

<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/legislacao/category/temas-3>

- Mubayi, A., Paredes, M., Ospina, J., Mubayi, A., Paredes, M., & Ospina, J. (2018). A Comparative Assessment of Epidemiologically Different Cutaneous Leishmaniasis Outbreaks in Madrid, Spain and Tolima, Colombia: An Estimation of the Reproduction Number via a Mathematical Model. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 3(2), 43. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3020043>
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet (London, England)*, 366(9496), 1561–1577. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)
- Neves, D. P., Melo, A. L., Linardi, P. M., & Vitor, R. W. A. (2004). *Parasitologia Humana* (11<sup>a</sup>). São Paulo: Atheneu.
- Nunes, A. A., Martinez, E. Z., Ana, L. W., Pazin-Filho, A., Coelho, E. ., & Mello, L. M. (2015). Vista do Testes diagnósticos contexto da avaliação de tecnologias em saúde: abordagens, métodos e interpretação. *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Brasil. Núcleo de Avaliação de Tecnologias em Saúde do Hospital das Clínicas da FMRP-USP.*, 48(1), 8–18.
- Oliveira, B. C., Mendes, A., Casiro, M. C. A. B., & Hernandez, V. P. (2016). American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Cytometry: A Review. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis*, 05(01). <https://doi.org/10.4172/2161-0703.1000222>
- Oliveira, L. F. G., Gilbert, B., & Bôas, G. K. V. (2014). Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Revista Fitos Eletrônica*, 8(1). Recuperado de <http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/192>
- OPAS / OMS. (2018). Informe epidemiológico das Américas - Leishmanioses. OPAS. Recuperado de [http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6\\_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y)
- Oyama, J., Ferreira, F. B. P., Conter, C. C., Lera-Nonose, D. S. S. L., Ramos-Milaré, Á. C. F. H., Venazzi, E. A. S., ... Lonardon, M. V. C. (2018). American tegumentary leishmaniasis: diagnostic and treatment challenges in a clinical

- case. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 60. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860003>
- Passos, J. P. da S. (2004). *Padronização do método de produção do antígeno para Intradermoreação de Montenegro* (Mestrado). Fiocruz, Rio de Janeiro. Recuperado de <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8435/2/154.pdf>
- Pedral-Sampaio, G., Alves, J. S., Schriefer, A., Magalhães, A., Meyer, R., Glesby, M. J., ... Carvalho, L. P. (2016). Detection of IgG Anti-Leishmania Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. *PLOS ONE*, 11(9), e0162793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162793>
- Pinto, I. de S., Santos, C. B. dos, Grimaldi, G., Ferreira, A. L., & Falqueto, A. (2010). American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cadernos De Saude Publica*, 26(2), 365–372.
- Quintella, L. P. (2010). *Diagnósticos diferenciais histopatológico das lesões cutâneas de Leishmaniose Tegumentar Americana*. (Tese de Doutorado). FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Recuperado de [https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9314/1/leonardo\\_quintella\\_ipecc\\_do\\_ut\\_2010.pdf](https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/9314/1/leonardo_quintella_ipecc_do_ut_2010.pdf)
- Rezende, J. M. (2009). *À sombra do plátano: crônica de história da medicina*. São Paulo: FAP-UNIFESP, Scielo. Recuperado de <https://berrowbes.firebaseio.com/aa536/sombra-do-pltano-crnicas-de-historia-da-medicina-portuguese-edition-by-joffre-marcondes-de-rezende-b00s5a232k.pdf>
- Roberts, T., Barratt, J., Sandaradura, I., Lee, R., Harkness, J., Marriott, D., ... Stark, D. (2015). Molecular epidemiology of imported cases of leishmaniasis in Australia from 2008 to 2014. *PloS one*, 10(3), e0119212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119212>
- Romão, P. R. T. (2008). Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde*, 3(1). Recuperado de <http://periodicos.unesc.net/saude/article/view/2>
- Roque, A. L. R., & Jansen, A. M. (2014). Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(3), 251–262. <https://doi.org/10.1016/J.IJPPAW.2014.08.004>

- Rosário, M. S., Oliveira, M. L., Lima, C. A., Vieira, M. A., Carneiro, J. A., & Costa, F. M. (2017). Transformações sócioespaciais no estado do Rio de Janeiro enquanto determinante social da saúde: no contexto das leishmanioses. *Hygeia*, 13(26), 198–210. <https://doi.org/10.14393/Hygeia132617>
- Rouquayrol, M. Z., & Filho, N. de A. (2006). *Introdução à epidemiologia*. (4<sup>o</sup> ed). Rio de Janeiro: Nova Guanabara.
- Saldiva, P. H. N., Veras, M., Saldiva, P. H. N., & Veras, M. (2018). Gastos públicos com saúde: breve histórico, situação atual e perspectivas futuras. *Estudos Avançados*, 32(92), 47–61. <https://doi.org/10.5935/0103-4014.20180005>
- SBP. (2003). Premunicação ou iminudade concomitante [Grossário]. Recuperado 6 de outubro de 2018, de [http://www.parasitologia.org.br/estudos\\_glossario\\_P.php](http://www.parasitologia.org.br/estudos_glossario_P.php)
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 581–592. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Sevilla-Santos, L., dos Santos Júnior, A. C. M., Medeiros-Silva, V., Bergmann, J. O., Segato, L. F., Arabi, A. Y. M., ... Gomes, C. M. (2018). Accuracy of qPCR for quantifying *Leishmania* kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. *Clinical Microbiology and Infection, Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.025>
- Shapira, M., & Zinoviev, A. (2011). *Leishmania* parasites act as a Trojan horse that paralyzes the translation system of host macrophages. *Cell Host & Microbe*, 9(4), 257–259. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.004>
- Shapiro, T. A., & Englund, P. T. (1995). The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annual Review of Microbiology*, 49, 117–143. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.001001>
- Shimabukuro, P. H. F., Tolezano, J. E., & Galati, E. A. B. (2011). Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do estado de São Paulo, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 51(27), 399–441. <https://doi.org/10.1590/S0031-10492011002700001>
- Silva, E. D. S., Lins, G. A., & Castro, E. M. N. V. de. (2016). Historicidade e olhares sobre o processo saúde-doença: uma nova percepção. *Revista Sustinere*, 4(2). <https://doi.org/10.12957/sustinere.2016.25976>
- Silveira, F. T., Lainson, R., Shaw, J. J., Garcez, L. M., Souza, A. A., Braga, R. R., & Ishikawa, E. A. (1990). Leishmaniose cutânea experimental: II - aspectos

- evolutivos da infecção no primata *Cebus apella* (Cebidae) pela *Leishmania* (V.) *Braziliensis* e *L. (L.) Amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 23(1), 5–12. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821990000100002>
- Simpson, L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review of Microbiology*, 41, 363–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002051>
- Skraba, C. M., Mello, T. F. P. de, Pedroso, R. B., Ferreira, É. C., Demarchi, I. G., Aristides, S. M. A., ... Silveira, T. G. V. (2015). Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(4), 437–444. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0067-2015>
- Soares, V. B., Almeida, A. S. de, Sabroza, P. C., & Vargas, W. P. (2017). Epidemiological surveillance of tegumentary leishmaniasis: local territorial analysis. *Revista de Saúde Pública*, 51(0). <https://doi.org/10.1590/s1518-8787.2017051006614>
- Suárez, M., Valencia, B. M., Jara, M., Alba, M., Boggild, A. K., Dujardin, J.-C., ... Adai, V. (2015). Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(7), e0003936. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003936>
- Tanure, A., Peixoto, J. C., Afonso, M. M. dos S., Duarte, R., Pinheiro, A. da C., Coelho, S. V. B., & Barata, R. A. (2015). Identification of Sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Blood Meals in an Endemic Leishmaniasis Area in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4), 321–324. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000400008>
- Taslimi, Y., & Rafati, S. (2018). Possible Diagnostic Improvement for Cutaneous Leishmaniasis: Is It Achievable? *Iranian Biomedical Journal*, 22(4), 215–216. <https://doi.org/10.29252/ibj.22.4.215>
- Tavares, C. A. P., Fernandes, A. P., & Melo, M. N. (2003). Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 3(5), 657–667. <https://doi.org/10.1586/14737159.3.5.657>



- Tavares, F. de M. (2007). *Reflexões acerca da Iatrogenia e Educação Médica*. Revista Brasileira de Educação Médica, FMC, MG. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbem/v31n2/09.pdf>
- Teixeira, E. O. (2017). Aspectos diagnósticos e terapêuticos da Leishmaniose Mucosa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde, Sup. 5, S210-S214*. Recuperado de [https://www.acervosaude.com.br/doc/S-8\\_2017.pdf](https://www.acervosaude.com.br/doc/S-8_2017.pdf)
- Thompson, M., Weigl, B., Fitzpatrick, A., & Ide, N. (2016). More Than Just Accuracy: A Novel Method to Incorporate Multiple Test Attributes in Evaluating Diagnostic Tests Including Point of Care Tests. *IEEE Journal of Translational Engineering in Health and Medicine, 4, 1–8*. <https://doi.org/10.1109/jtehm.2016.2570222>
- Tonelli, G. B. (2017). *Estudo eco-epidemiológico dos hospedeiros e reservatórios de Leishmania na Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, Minas Gerais*. Fiocruz. Recuperado de <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/18301>
- Vale, E. C. S. do, & Furtado, T. (2005). Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. *Anais Brasileiros de Dermatologia, 80(4)*, 421–428. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962005000400015>
- Veras, P., Bezerra de Menezes, J., Veras, P. S. T., & Bezerra de Menezes, J. P. (2016). Using Proteomics to Understand How Leishmania Parasites Survive inside the Host and Establish Infection. *International Journal of Molecular Sciences, 17(8)*, 1270. <https://doi.org/10.3390/ijms17081270>
- Vieira, S. (2015). *Introdução a bioestatística*. (5ª). Elsevier.

## APÊNDICE 1. Parecer Consubstanciado do CEP

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** VALIDAÇÃO DA INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO E IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA NA DIFERENCIAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.

**Pesquisador:** Ciro Martins Gomes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 37190914.0.0000.5558

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário de Brasília - HUB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 908.061

**Data da Relatoria:** 25/11/2014

#### **Apresentação do Projeto:**

Vide parecer prévio

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Vide parecer prévio

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Vide parecer prévio

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Vide parecer prévio

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os pesquisadores acrescentaram o TCLE correspondente para a situação em que haverá a oportunidade de abordagem dos participantes prospectivamente.

#### **Recomendações:**

Nenhuma

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -  
UNB



Continuação do Parecer: 908.061

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Parecer aprovado pelo Colegiado, que, à unanimidade, acolheu o voto do(a) Relator(a). A sessão ocorreu em 10 de dezembro de 2014.

BRASILIA, 10 de Dezembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Diaulas Costa Ribeiro**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br