



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

ELIAME MOUTA CONFORT

**ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO COM ANTÍGENO DE
Leishmania (Viannia) braziliensis NO DIAGNÓSTICO
E ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

RIO DE JANEIRO

2009

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO COM ANTÍGENO DE
Leishmania (Viannia) braziliensis NO DIAGNÓSTICO E
ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

ELIAME MOUTA CONFORT

Tese apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas para obtenção do
grau de Doutor.

Orientadores:
Prof. Dr. Armando de Oliveira Schubach
Prof. Dr. Mauro Célio de Almeida Marzochi

Rio de Janeiro

2009

*A meus pais, Carlos (em memória) e Syla, aos meus filhos Mariana, Carlos e netas
Maria Clara e Gabriela pela compreensão, carinho, alegrias e amor que trazem à
minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Aos Drs. Armando de O. Schubach e Mauro C. de Almeida Marzochi, pela orientação científica, incentivo e apoio recebidos durante a realização deste trabalho.

A todos os profissionais do laboratório que contribuíram direta ou indiretamente para a realização das análises, especialmente dos exames sorológicos e levantamento de dados de prontuários, Andreia Alves da Silva, Elaine Mota Costa Flávia Coelho Ribeiro, Lilian Dias Nascimento, Marta Santiago, Fernanda Puga.

À Dra. Fátima Madeira e equipe, pela realização dos exames diretos e isolamentos realizados, pelo incentivo e compreensão nas ausências do laboratório, necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

À Dra Aline Fagundes, pelos resultados da PCR e contribuição com inúmeros dados relativos aos pacientes.

Ao Dr. Leonardo Quintella pelos resultados de histopatologia.

À Dra. Sônia Lambert, pela valiosa contribuição dada em introdução à estatística e epidemiologia, e por conseguir tornar quase amigável a minha relação com alguns “softwares” estatísticos.

Aos médicos do ambulatório do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish) – IPEC, pelas contribuições de caráter clínico dos pacientes, e aos demais profissionais por suas participações quando necessário.

À Dra. Fátima da Conceição-Silva, pelo trabalho de revisão, críticas, sugestões e incentivo constante recebidos.

Aos pacientes, pela permissão e sua indispensável colaboração para realização deste trabalho.

Aos órgãos financiadores de pesquisa, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e à FIOCRUZ, pela possibilidade de desenvolvimento deste trabalho.

*“Procurar significa: ter uma meta. Mas achar significa:
estar livre, abrir-se a tudo, não ter meta alguma”.*

Hermann Hesse

Mouta-Confort, E. **Ensaio Imunoenzimático com Antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no Diagnóstico e Acompanhamento de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana**. Rio de Janeiro 2009. xxx f. [Tese de Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.]. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

RESUMO

Avaliou-se o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) com antígeno de *Leishmania (V.) braziliensis* para a investigação diagnóstica da leishmaniose tegumentar americana (LTA) em suas modalidades cutânea (LC) e cutâneomucosa (LCM) e avaliação da resposta terapêutica a partir de amostras de soro de pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC). O grupo I, LTA (n=153) foi formado com amostras de soros de pacientes com pelo menos um resultado positivo nos exames parasitológicos ou na reação em cadeia da polimerase (PCR), e o grupo II, controle (n=103), com amostras de indivíduos representativos da população do estudo, com suspeita inicial de LTA, mas com outro diagnóstico confirmado. As seguintes informações foram obtidas dos prontuários: avaliação clínica, dermatológica e otorrinolaringológica; intradermoreação de Montenegro IDRМ; pesquisa de *Leishmania* por exame direto e histopatológico, isolamento em meio de cultura, PCR e exames diretos com colorações especiais, inoculação em meios de cultura para fungos e micobactérias. As amostras foram obtidas nas fases de investigação diagnóstica e pós-tratamento em períodos definidos até dois anos. Comparou-se a sensibilidade do ELISA com a de cada um dos métodos parasitológicos, PCR e com a IDRМ. Para avaliação da resposta terapêutica, amostras de 75 pacientes que se mantiveram com as lesões cicatrizadas durante o período do estudo constituíram o subgrupo cura terapêutica (ICT) e aquelas de 31 pacientes com recidivas constituíram o subgrupo recidiva pós-terapêutica (IRT). A confiabilidade do teste avaliado pelo coeficiente de correlação intraclasse foi de 0,953 (IC 95%). Encontrou-se sensibilidade de 94,7%, especificidade de 95,1% e valores preditivos, positivo e negativo de 96,6% e 92,4% respectivamente. Não houve diferença com significância estatística entre as sensibilidades encontradas no ELISA, na PCR e na IDRМ (CI= 95%, qui-quadrado p-valor=0,140 e p-valor=0,498). O mesmo não ocorreu com os demais métodos parasitológicos (p-valor<0,001). A análise da resposta humoral à terapia demonstrou haver redução da resposta de anticorpos nos pacientes do subgrupo ICT significativamente menor aos seis meses após o tratamento (Wilcoxon; p-valor=0,016) com 51,8% de pacientes não reatores ao final de dois anos após a terapia. Os demais se encontravam fracamente reatores. Ao contrário, no subgrupo IRT, houve pequena redução seguida de elevação dos valores de densidade ótica atingindo patamares mais elevados na ocasião da recidiva. Comparando-se estes subgrupos (ICT e IRT) quanto à intensidade das reações e frequência de reatores, em cada ponto do acompanhamento, encontraram-se diferenças a partir do sexto mês após a terapia e a cura clínica (Mann-Whitney; p-valor=0,046 e p-valor 0,009). Os resultados demonstram um bom desempenho do ELISA no diagnóstico diferencial de LTA e na avaliação da resposta terapêutica.

Palavras chaves: leishmaniose tegumentar Americana, ELISA, controle de cura, controle pós-terapia, *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Mouta-Confort, E. **Enzyme immunoassay with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigen in the Diagnosis and Monitoring of Patients with Cutaneous Tegumentar Leishmaniasis.** Rio de Janeiro 2009 [Tese de Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.]. Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

ABSTRACT

Indirect Enzyme Immunoassay (ELISA) was evaluated with *Leishmania (V.) braziliensis* antigen to the diagnostic workup of American Tegumentary Leishmaniasis (American Tegumentary Leishmaniasis - ATL) in their cutaneous (CL) and mucocutaneous (MCL) modalities, and about the therapeutic response from samples of serum from patients at the Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC). *Group I*, ACL (n = 153) was formed with sera samples of patients with at least one positive result in parasitological examinations or in polymerase chain reaction (PCR), and *group II, control* (n = 103), with samples of individuals representative of the study population, with initial suspicion of ACL, but with other confirmed diagnosis. The following information was obtained from medical records: clinical, dermatological, and otorrinolaringology evaluation; measure in mm of Montenegro intradermoreaction (IDRM); search for *Leishmania* by direct examination and histopathology, isolation in culture media, PCR and direct examination with special staining and inoculation in culture media for fungi and mycobacteria. Samples were obtained during the diagnostic workup and after treatment, in periods defined as up to two years. We compared the sensitivity of the ELISA with each of the individual parasitological methods, the PCR, and the IDRM. To evaluate the therapeutic response, samples of 75 patients who remained with the lesions healed during the study period were the *therapeutic healing subgroup (ICT)* and those 31 patients with recurrences were the *post-therapy relapse subgroup (IRT)*. The reliability of the test assessed by the intraclass correlation coefficient was 0.953 (95% CI). We found a sensitivity of 94.7% and 95.1% specificity, and positive and negative predictive values of 96.6% and 92.4%, respectively. There was no statistically significant difference between the sensitivities found in ELISA, PCR and IDRM (95% CI, Chi-square p -value = 0.140 and p -value = 0.498). The same did not happen with the remainder parasitological methods (p -value <0.001). The analysis of the humoral response to therapy have demonstrated a decrease of the antibody response in patients of *subgroup ICT*, significantly lower at six months after treatment (Wilcoxon; p -value = 0.016), with 51.8% of patients non reactors at the end of two years after the therapy. The others remained mild reactors. Contrarily, in *subgroup IRT*, a small reduction of the intensity of the reactions, was followed by the increase in the values of optical density that reached higher levels during recidive. Analyzed together, the results of samples from the *IRT subgroup* were significantly higher than those from the *ICT subgroup* (Mann-Whitney; p -value <0.0001). The intensity of reactions and the frequency of reactors there were reduce from the six months after the therapia sustaining this tendency after the clinical cure. When comparing the intensity of reactions and frequency of reactors in each point of follow-up there were differences from the sixth month of therapy and clinical cure (Mann-Whitney; p -value = 0.046 and p -value 0.009). The results show a good performance of the ELISA in the differential diagnosis of ACL and the assessment of therapeutic response.

Key-words: American Cutaneous Leishmaniasis, ELISA, control, cure and controls post-therapy, *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Grupos do estudo para determinação da acurácia do ELISA	37
Tabela 2. Resultados de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e negativa (RVN), intervalo de confiança, (IC).	39
Tabela 3. Médias de densidade óptica (DO), desvio padrão (dp) e medianas das unidades arbitradas (UA) obtidas no ELISA com as amostras analisadas. (LTA) leishmaniose tegumentar americana), (LC) leishmaniose cutânea, (LCM) leishmaniose cutaneomucosa.....	41
Tabela 4. Comparação entre a sensibilidade do ELISA e IDR, PCR e métodos parasitológicos.....	42
Tabela 5. Concordância de resultados do ELISA com IDR.....	43
Tabela 6. Concordância de resultados do ELISA com PCR.	43
Tabela 7. Resultados de associações do ELISA e da IDR em paralelo e em série com os respectivos desvios padrão para o diagnóstico de LTA.	43
Tabela 8. Número de pacientes, de amostras analisadas e mediana das unidades arbitradas (UA) do ELISA. Grupos: ICT – amostras de pacientes com cura após tratamento; grupo IRT – amostras de pacientes com reativação da lesão após tratamento. Med- mediana; IIQ- intervalo interquartil.....	45
Tabela 9. Comparação das medianas (med) das unidades arbitradas obtidas com as amostras do subgrupo I CT (cura após tratamento) no período avaliado.....	46
Tabela 10. Medianas (med) das unidades arbitradas (UA) no ELISA das amostras de pacientes com reativação (IRT) coletadas antes e após tratamento.....	47
Tabela 11. Soroprevalência de IgG detectada por ELISA e mediana das unidades arbitradas (UA) em amostras de pacientes com reativação coletadas antes e após: o tratamento inicial (I RT1), o segundo tratamento (I RT2) ou o terceiro tratamento (I RT3).....	50
Tabela 12. Percentuais de amostras com unidades arbitradas maiores que 2 (%UA>2) nos subgrupos (ICT) pacientes com lesão cicatrizada e (IRT1) pacientes antes da reativação. (N), número de amostras analisadas.	53
Tabela 13. Razão de chances (odds ratio; OR) de recidiva em pacientes com unidades arbitradas no ELISA maior que 2 (UA>2) comparado aos que não recidivaram (subgrupo ICT) no período acompanhado.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Confiabilidade do ELISA, leitura de densidade óptica (DO) em duas análises estimado pelo coeficiente de correlação intraclasses de 0,953; Intervalo de confiança de 95% = 0,939 - 0,963.....	38
Gráfico 2. Área sob a curva ROC obtida com o ELISA, 0,967 Intervalo de confiança de 95% = 0,943 a 0,992).....	38
Gráfico 3. Distribuição dos valores de unidades arbitradas (UA) obtidas no ELISA com amostras dos grupos I (LC-leishmaniose cutânea e LCM - leishmaniose cutâneo-mucosa) e II (controles).....	40
Gráfico 4. Comparação entre as sensibilidades do ELISA, IDRM, PCR e métodos parasitológicos.....	42
Gráfico 5. Distribuição dos valores de unidades arbitradas (UA) de IgG no ELISA no grupo com cura até dois anos após tratamento (subgrupo grupo ICT) avaliados: no diagnóstico (D), imediatamente após tratamento (pt) 1mês (1m), 3 meses (3m), 6 meses (6m), 1 ano (1a) e 2 anos (2a) após o tratamento e nos (C) controles.....	46
Gráfico 6. Resultados da reatividade, em unidades arbitradas (UA), do ELISA em amostras de pacientes com reativações coletadas antes, durante e após: (A) tratamento inicial (IRT1), (B) segundo tratamento (IRT2) terceiro tratamento (IRT3)	49
Gráfico 7. Médias e desvios padrão das unidades arbitradas (UA) de soros de pacientes do subgrupo IRT (IRT1, IRT2 e IRT3) avaliados por ELISA.	51
Gráfico 8. Medianas das unidades arbitradas (UA) no ELISA de amostras de soros de pacientes que se mantiveram com lesões cicatrizadas após tratamento (subgrupo ICT) e do subgrupo com reativação das lesões (IRT), após o primeiro (IRT1), segundo (IRT2) ou terceiro tratamentos (IRT3).	53
Gráfico 9. Percentual de soros com unidade arbitrada maior que dois (% de UA > 2) nos subgrupos (ICT) com cura das lesões e (IRT1) antes da reativação.	54
Gráfico 10. Reatividade no ELISA em unidade arbitrada (UA), de soros de sete pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa distribuídos nos subgrupos ICT (cicatrização das lesões) e IRT (com reativação de lesões).	56

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AUC** – (*Area under the ROC curve*) Área sob a curva ROC
- BHI** – *Brain Heart Infusion*
- C** - controles
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- CN** – Controle Negativo
- CP** – Controle Positivo
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- DO** – Densidade óptica
- ELISA** – (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) Ensaio imunoenzimático indireto
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HRP** – Peroxidase
- IC** – Intervalo de Confiança
- ICC** – (*Intraclass Correlation Coefficient*) Coeficiente de Correlação Intraclasse
- ICT** – amostras do grupo I que apresentou cura clínica após o tratamento
- IDRM** – intradermorreação de Montenegro
- IFN γ** – Interferon gama
- IgA** – Imunoglobulina A
- IgG** – Imunoglobulina G
- IgG1** – Imunoglobulina G1
- IgG2** – Imunoglobulina G2
- IgG3** – Imunoglobulina G3
- IgG4** – Imunoglobulina G4
- IgM** – Imunoglobulina M
- IL** – Interleucina
- IL-10** – Interleucina -10
- IL-12** – Interleucina -12
- IL-2** – Interleucina 2
- IL-4** – Interleucina-4
- IPEC** – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
- IRT** – amostras de pacientes do grupo I que apresentou recidiva após o tratamento
- IRT1** – amostras do grupo I após o primeiro tratamento

IRT2 – amostras do grupo I após o segundo tratamento
IRT3 – amostras do grupo I após o terceiro tratamento
IIQ – intervalo interquartil
LC - Leishmaniose cutânea
LCD - Leishmaniose cutânea difusa
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LCM – Leishmaniose cutaneomucosa
LD – Leishmaniose cutânea disseminada
LM – Leishmaniose mucosa
LT – Leishmaniose tegumentar
LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LV – Leishmaniose visceral
L (V) braziliensis – *Leishmania (Viannia) braziliensis*
Med – mediana
MedCalc vs 8 – versão 8 programa estatístico MedCalc
mL – mililitro
MS – Ministério da Saúde
NK – natural killer
NNN – meio de cultivo McNeal, Novy & Nicolle
ODP – Outro diagnóstico provável
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPD – 1, 2-Ortofenilenodiamino
OR – (*Odds ratio*) – Razão de chances
PBS – Salina tamponada com fosfatos
PBS-T – Salina tamponada com fosfatos com Tween
PBS-TL – Salina tamponada com fosfatos com Tween e com leite desnatado
PCR – Reação em cadeia da polimerase
pH – Potencial Hidrogeniônico
RR – risco relativo
R1 – Primeira reativação
R2 – Segunda reativação
RFC – Reação de fixação de complemento
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
RJ – Rio de Janeiro

RNA – Ácido ribonucleico

ROC – (*Receiver Operator Characteristic*) – *Curva ROC*

RVN – Razão de verossimilhança negativa

RVP – Razão de Verossimilhança positiva

SFB – Soro fetal bovino

SPSS – *Statistical Package for the Social Science*

SUS – Sistema Único de Saúde

DAT – (direct agglutination test) Teste de aglutinação direta

Th1 – Células TCD4+ secretoras do padrão um de citocinas

Th2 – Células TCD4+ secretoras do padrão dois de citocinas

TMB – 3, 3', 5, 5'-Tetrametilbenzidina

Treg – Células T regulatórias

TT – grupo teste terapêutico

UA – Unidade arbitrada

Vigileish – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

µg – micrograma

µL – microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	ASPECTOS GERAIS E HISTÓRICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA .	4
2.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	5
2.3	ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNE	9
2.4	DIAGNÓSTICO	18
2.4.1	Exames parasitológicos.....	18
2.4.2	Métodos imunológicos.....	19
3	OBJETIVO GERAL.....	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	28
4.1.1	Aspectos éticos	28
4.1.2	Grupos de estudo	29
4.1.3	Critérios de elegibilidade	30
4.1.4	Tamanho amostral e coleta	30
4.2	REALIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS.....	31
4.2.1	Antígenos.....	31
4.2.2	ELISA.....	32
4.2.3	Comparação de ELISA com IDRM, PCR e métodos parasitológicos.....	33
4.2.4	Associação de ELISA e IDRM para diagnóstico.....	34
4.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS	315
4.3.1	Variáveis de interesse	35
4.3.2	Análise estatística	35
5	RESULTADOS.....	37
5.1	ELISA	37
5.1.1	Confiabilidade	37
5.1.2	Acurácia.....	38
5.1.3	Correlações.....	39
5.2	. COMPARAÇÃO DE ELISA COM IDRM, PCR E MÉTODOS PARASITOLÓGICOS	41
5.3	ASSOCIAÇÃO DOS MÉTODOS ELISA E IDRM PARA O DIAGNÓSTICO.....	43

5.4	. AVALIAÇÃO DO ELISA NO CONTROLE PÓS-TRATAMENTO DE PACIENTES COM LTA	44
5.4.1	Acompanhamento sorológico por ELISA no <i>subgrupo I CT</i> - pacientes com lesões cicatrizadas até dois anos pós-tratamento.....	45
5.4.2	Acompanhamento sorológico por ELISA no <i>subgrupo I RT</i> - pacientes com reativações até dois anos pós-tratamento.....	47
5.4.3	Comparação da resposta de IgG nos subgrupos de pacientes com cicatrização (<i>ICT</i>) e pacientes com reativação de lesões pós-tratamento (<i>IRT</i>).....	52
5.4.4	Controle pós-tratamento de pacientes com LCM.....	55
6	DISCUSSÃO	57
7	CONCLUSÕES	70
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
	ANEXO I- APROVAÇÃO NO CEP/IPEC	85
	ANEXO II- PROTOCOLO DE ATENDIMENTO CLÍNICO	87
	ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	95
	ANEXO IV - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE	101

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a evidenciação direta do parasito, em esfregaço em lâmina de escurificado do bordo da lesão corado pelo Giemsa, é o procedimento adotado para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA) pela rede de laboratórios do Sistema Único de Saúde (SUS), Ministério da Saúde (MS), por ser de fácil execução e baixo custo. Entretanto, tal técnica demanda tempo e treinamento do operador ao microscópio, sendo considerada pouco sensível (MS, 2007).

A intradermorreação de Montenegro (IDRM), com sensibilidade e especificidade consideradas próximas a 100%, é amplamente usada no diagnóstico da LTA e em inquéritos epidemiológicos. Contudo, alguns fatores limitam a sua utilização tais como a permanência de positividade do teste por longo tempo após a infecção ou doença e a possibilidade de resultados falso negativos no primeiro mês de infecção (Marzochi et al., 1980; Cuba Cuba et al., 1985; MS, 2007).

No Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (Vigileish) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), o diagnóstico de LTA é estabelecido com base no exame histopatológico, imunohistoquímica, exame direto, reação em cadeia da polimerase (PCR), isolamento do parasito em meio de cultura, IDRM e testes sorológicos. Por sua complexidade e custo, esta rotina de diagnóstico próxima do ideal, não é possível de ser realizada em unidades primárias de atenção á saúde, sendo limitada a instituições de pesquisa. Entretanto, limitações inerentes aos métodos parasitológicos e à escassez de parasitos nas lesões de indivíduos infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis (L. (V) braziliensis)*, espécie quase que totalmente responsável pela doença no Estado do Rio de Janeiro, podem contribuir para a ocorrência de resultados falsos negativos.

Na LTA a produção de anticorpos específicos é predominantemente constituída por imunoglobulina G (IgG), independente da forma clínica (Guimarães et al., 1989). Porém, as concentrações séricas detectadas em testes sorológicos variam de baixas a moderadamente elevadas. Estas oscilações estão relacionadas às formas clínicas e também a características individuais. Atualmente, o ensaio imunoenzimático (ELISA) e a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) são as técnicas mais empregadas. Entretanto, a possibilidade do encontro de resultados falsos negativos e ou de reações inespecíficas, relatada por alguns autores, limita a indicação dos testes sorológicos para o diagnóstico (Cuba Cuba et al., 1980; Ulrich et al., 1988; MS, 2007).

A experiência acumulada por profissionais do Vigileish com testes sorológicos na rotina de diagnóstico e o seguimento de pacientes com LTA sugerem que o ELISA pode ser particularmente útil em quatro situações: a) estabelecimento do diagnóstico em pacientes com forte suspeita clínica e epidemiológica de LTA e testes sorológicos positivos, porém, com exames parasitológicos negativos; alguns pacientes submetidos a teste terapêutico; b) para afastar o diagnóstico de LTA em pacientes com investigação inconclusiva, cujos sinais clínicos sugeriam outras enfermidades, particularmente, esporotricose atualmente endêmica no Rio de Janeiro; c) controle de cura ou indicador de reativação, após o tratamento para LTA.

Na RIFI, utilizam-se parasitos íntegros como antígenos. No ELISA, podem ser utilizados parasitos íntegros, extratos parasitários, antígenos purificados ou proteínas recombinantes. Todavia, até o momento, não se dispõe de “kits” comerciais para o diagnóstico da LTA humana por este método.

Neste estudo, avaliou-se o ELISA com extrato parasitário parcialmente solúvel de *L. (V.) braziliensis* para detecção de IgG anti-*Leishmania* em amostras de soros,

realizado paralelamente aos métodos parasitológicos clássicos, PCR e IDRM, durante o atendimento rotineiro de pacientes encaminhados para diagnóstico de LTA. Além disso, verificou-se a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do ELISA com antígeno de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e investigaram-se as possíveis associações entre imunoglobulinas específicas da classe G (IgG) e resposta terapêutica imediata e tardia, até dois anos após o tratamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS E HISTÓRICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

As leishmanioses, em suas modalidades tegumentares e visceral, são antropozoonoses causadas por parasitos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* (Hommel, 1978; WHO, 2009). As leishmanioses cutâneas ocorrem no Velho e no Novo Mundo com grande prevalência na América do Sul, no Norte da África e na Ásia Central e Oriental. Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2009) a incidência anual das leishmanioses no mundo é de dois milhões, sendo um milhão e meio de LTA. São consideradas, atualmente, “doenças negligenciadas” e em expansão crescente. A leishmaniose tegumentar americana (LTA), denominação que agrega as modalidades, cutânea e cutaneomucosa, objeto do nosso estudo, se distribui desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina. Dentre os países da América do Sul, o Brasil é o que apresenta a maior prevalência de LTA com média anual de 28.568 casos autóctones registrados no período de 1985 a 2005 (MS, 2007), distribuídos por todos os estados. Além da ampla distribuição geográfica, a severidade das lesões em alguns casos, agravada pela possibilidade de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), fazem das leishmanioses um permanente alvo da atenção dos órgãos de saúde pública no País e no mundo (WHO, 2009).

Há evidências da presença da doença em cerâmicas peruanas e equatorianas, datadas de 400 a 900 d.C., com representações de mutilações de

nariz e de boca com aspecto semelhante à leishmaniose cutaneomucosa. Além disso, a doença pode ter sido documentada por “cronistas” do século XVI que descreveram lesões cutâneas de face também sugestivas de LTA em populações da Amazônia Ocidental (Altamirano-Enciso et al., 2003). Em 1895, Moreira identificou a doença no Brasil e em 1911, Gaspar Vianna, denominou *Leishmania braziliensis*, o agente etiológico da “úlceras de Bauru”, “ferida brava” (lesão cutânea) ou “nariz de tapir” (lesão cutaneomucosa), espécie diferente das encontradas no Velho Mundo (Vianna, 1911; Vianna, 1912). No ano seguinte, o próprio Gaspar Vianna comprovou o valor do antimonial (tártaro emético) no tratamento da LTA (Vianna, 1914).

Desde o século XVIII suspeitava-se da transmissão da doença por flebotomíneos, entretanto, o papel dos vetores só foi demonstrado em 1921 no Velho Mundo por Sergent et al., 1921 e em 1922, no Brasil, por Aragão.

Contribuições significativas para a prática clínica, diagnóstico, tratamento e, em certa medida, para o controle da doença ocorreram nas três primeiras décadas do século XX, considerando-se ainda a introdução da IDRM como método auxiliar ao diagnóstico e à epidemiologia introduzida por Montenegro em 1926.

Até o início da década de 70, apenas *L. braziliensis* era conhecida como causadora da LTA no Brasil. Em 1970, Lainson & Shaw, identificaram *L. mexicana amazonensis* como agente causal da leishmaniose cutânea difusa na região Centro-Oeste do país.

2.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Inicialmente associada aos ambientes silvestres, nas últimas décadas a LTA vem-se tornando cada vez mais frequente em áreas periurbanas e urbanas, sendo associada, à mobilidade das populações, muitas vezes em ondas migratórias, a

modificações do meio ambiente, adaptação de vetores ao peridomicílio e a condições sócio-econômicas precárias (Marzochi & Marzochi, 1994; 1997).

Nas Américas, a transmissão de *Leishmania* sp. ao ser humano, mamíferos domésticos e silvestres, se dá pela picada de fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* infectados com formas evolutivas flageladas (promastigotas) presentes no trato digestivo do vetor invertebrado. Estas penetram nas células do sistema fagocítico mononuclear da pele e/ou de mucosas das vias aéreas superiores, formando vacúolos parasitóforos, onde se transformam em formas amastigotas, com flagelos interiorizados, multiplicam-se e evadem-se infectando novas células (REY, 2001).

As diferentes espécies de *Leishmania* com características dermatotrópicas, identificadas no Brasil, pertencem aos subgêneros *Viannia* (Lainson and Shaw, 1972) e *Leishmania* (Safianova 1982), classificação proposta por Lainson & Shaw (1987) para as *Leishmania* spp do Novo Mundo, são elas: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Viannia) naiff*, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (MS, 2007; Silveira et al., 2004).

No Brasil, as diferentes espécies de *Leishmania* podem produzir no ser humano lesões cutâneas (LC) e mucosas (LM). As lesões cutâneas podem ser: localizadas - únicas ou múltiplas (leishmaniose cutânea localizada - LCL); disseminadas (leishmaniose cutânea disseminada - LD) ou difusas (leishmaniose cutânea difusa - LCD). Nas mucosas pode ocorrer a forma primária, por inoculação direta do parasito na mucosa próxima a superfície cutânea; a forma secundária tardia, após cura da lesão cutânea primária; e a forma isolada, de origem não determinada, em mucosas internas, sem comprometimento cutâneo aparente. Em

alguns pacientes pode haver o acometimento simultâneo da pele e da mucosa (leishmaniose cutaneomucosa - LCM). Nestes casos, o envolvimento da mucosa pode ocorrer por contiguidade com a lesão cutânea primária ou surgir de forma concomitante a lesões cutâneas com localização distante (Marzochi & Marzochi, 1994). A LCL é a forma de manifestação mais frequentemente observada, podendo evoluir para cura espontânea das lesões. As demais manifestações ocorrem em percentual reduzido, estando sua ocorrência relacionada ao potencial patogênico de algumas espécies e a fatores do hospedeiro. Alguns casos assumem caráter de doença crônica e podem apresentar resistência ao tratamento. As formas disseminadas, mucosas e cutaneomucosas são, em sua maioria, produzidas por *L. (V.) braziliensis* e mais raramente por *Leishmania (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, enquanto a forma difusa é quase sempre causada por *L. (L.) amazonensis* (Barral et al., 1991; Marzochi & Marzochi, 1994).

Os insetos vetores da LTA pertencem à ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*, conhecidos por diferentes nomes em diferentes regiões do país. As principais espécies potencialmente infectantes para o ser humano são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei* (Marzochi and Marzochi, 1997). Diversos animais silvestres e domésticos são encontrados naturalmente infectados com as espécies de *Leishmania*. Porém, em sua maioria, não são considerados possíveis reservatórios naturais. O conceito de reservatório inclui, entre outros requisitos, a comprovação por métodos científicos da manutenção do parasito no meio ambiente pelo reservatório, o que ainda não aconteceu nestes casos (Grimaldi & Tesh, 1993; MS, 2007). Contrariamente, na leishmaniose visceral, parasitos estão presentes em abundância na pele e vísceras

de cães infectados com *Leishmania chagasi*, sintomáticos ou não (Madeira et al., 2009).

Em função das características dos parasitos, condições ambientais e características biológicas de vetores e à capacidade de adaptação a ambientes modificados pelo ser humano, são definidos três padrões epidemiológicos de transmissão da LTA: silvestre, ocupacional e lazer, e rural e periurbano (MS, 2007).

L. (V.) braziliensis é encontrada na América do Sul e Central, estando amplamente distribuída em todo o território nacional, infectando roedores silvestres (*Bolomys lasiurus*, *Nectomys squamips*) e sinantrópicos (*Rattus rattus*), gatos (*Felis catus*), cães (*Canis familiaris*) e equídeos (*Equus caballus*, *Equus asinus*). Considerados prováveis reservatórios silvestres, os roedores estão envolvidos na transmissão em áreas silvestres e em ambientes modificados, periurbanos e urbanos, possivelmente com o envolvimento de animais sinantrópicos e domésticos (Marzochi, 1992; Tolezano, 1994).

L. (L.) amazonensis é encontrada principalmente em áreas de terra firme da bacia amazônica em alguns estados do Norte, do Nordeste e da região Sudeste do Brasil (Furtado & Vieira, 1982; MS 2007). No Rio de Janeiro há referência a apenas um caso autóctone devido a esta espécie (Azeredo-Coutinho et al., 2007). Os vetores desta espécie são *L. flaviscutellata*, com ampla distribuição geográfica, e as espécies *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva*, encontradas nos estados do Amazonas e Rondônia. Os prováveis animais reservatórios são roedores silvestres dos gêneros *Proechymis* e *Oryzomys*.

Entre as demais espécies de *Leishmania* a que acomete o maior número de indivíduos é *L. (V.) guyanensis*, cuja transmissão se dá em ambientes silvestres na região Norte (Marzochi & Marzochi, 1994; MS 2007).

Atualmente são conhecidas diversas espécies de *Leishmania* causadoras da doença humana no Brasil. Destas as mais amplamente distribuídas é *L. (V.) braziliensis* que pode ser encontrada em todos os estados, inclusive no Rio de Janeiro (MS, 2007).

2.3 ASPECTOS GERAIS DA RESPOSTA IMUNE

Apesar dos esforços empregados em pesquisas nas últimas décadas visando à compreensão dos mecanismos de resposta imune nas leishmanioses, os avanços obtidos ainda não permitem o pleno entendimento da funcionalidade das células e moléculas envolvidas neste processo. Assim, resistência e susceptibilidade à doença persistem com muitos pontos obscuros. As diferentes espécies de *Leishmania*, fatores genéticos dos parasitos e do hospedeiro levam a diferentes eventos imunológicos com manifestações clínicas diversas (Grimaldi, 1982; Marzochi & Marzochi, 1994; Silveira et al., 2004).

A LC é quase sempre benigna, com lesões que podem ser auto-resolutivas e, geralmente, responde bem à terapia. Cerca de 3% dos casos de infecção por *L. (V.) braziliensis* podem apresentar lesões primárias ou secundárias em mucosas que, se não tratadas, podem evoluir de forma desfigurante e/ou mutilante (Grimaldi, 1982). A gravidade da doença está mais relacionada à resposta imunológica exacerbada que à ação direta de *Leishmania* sobre os tecidos. Aliás, costuma haver escassez de parasitos nas lesões, mas se observa positividade à IDR. Contrariamente, a LCD que acomete uma pequena proporção de infectados por *L. (L.) amazonensis*, cursa com intenso parasitismo e reduzida atividade da resposta imunológica protetora (Marzochi & Marzochi, 1994). Isto pode ser demonstrado pela ausência de

reatividade à IDRM e à resposta linfoproliferativa “in vitro” das células destes pacientes a antígenos de *Leishmania*. (Silveira et al., 2004)

Modelos experimentais de leishmaniose tegumentar (LT) podem ser empregados para algumas espécies de *Leishmania*. Por exemplo, *L. major* (no Velho Mundo) e *L. (L.) amazonensis* podem ser estudadas em animais geneticamente susceptíveis e em animais pouco susceptíveis. Todavia, a infecção por *L. (V.) braziliensis* não é reproduzida em camundongos, em sua maioria resistente à infecção. Os animais que melhor desenvolvem o modelo da doença humana causada por *L. (V.) braziliensis* são o macaco rhesus (Grimaldi, 2008) e o cão (Pirmez et al., 1988), este último frequentemente encontrado naturalmente infectado na região sudeste. Portanto, grande parte do conhecimento experimental relativo à imunologia da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* foi obtido em estudos com células de pacientes humanos, a partir de experimentos *ex vivo* (Conceição-Silva et al., 1988; Campanelli et al., 2006; Morgado et al., 2008).

A complexidade de eventos, de células e moléculas envolvidas na relação parasito/hospedeiro, tem início no momento da inoculação das formas promastigotas pelos flebotomíneos, quando a participação da saliva do vetor pode ser determinante para o progresso da infecção (Titus & Ribeiro, 1988).

Saliva de flebotomíneos possui um conjunto de moléculas que inibe os mecanismos hemostáticos do hospedeiro modificando a resposta inflamatória e a resposta imune a *Leishmania* sp. (Titus & Ribeiro, 1988; Kamhawi, 2000). Diversos estudos foram desenvolvidos visando esclarecer o papel da saliva no desenvolvimento inicial da lesão (Costa et al., 2004; Menezes et al., 2008). Por outro lado, observaram-se em estudos experimentais que componentes da saliva induzem a produção de anticorpos e de resposta celular de hipersensibilidade do tipo tardia e

que este fenômeno (resposta imune à saliva) está associado à proteção contra a infecção por *Leishmania* sp. (Belkaid et al., 2000a). Tais estudos foram conduzidos, em sua maioria, com extrato bruto de glândula salivar de flebotomíneos. Em soro de indivíduos de área endêmica, portanto expostos a sucessivas picadas de flebotomíneos, infectados ou não, detectaram-se anticorpos anti-componentes de saliva. Os mecanismos envolvidos e a generalização desses achados para as diversas espécies de flebotomíneos e de hospedeiros continuam sendo objeto de pesquisas (Kamhawi et al., 2000).

O primeiro contato do parasito com o hospedeiro envolve componentes celulares da resposta inata: células fagocíticas, macrófagos, basófilos, eosinófilos, mastócitos, células natural killer (NK), e células dendríticas (células Langerhans). Além disso, moléculas tais como proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda e interferons fazem parte do cenário inicial. As células T CD4+ e T CD8+ são os componentes efetores da imunidade adquirida, necessárias para o desenvolvimento de uma resposta protetora, participando do processo após ativação e apresentação dos antígenos pelas células apresentadoras, células dendríticas, macrófagos e possivelmente células B (Von Stebut, 2007).

Leishmania spp. possuem diversos mecanismos de evasão das defesas do hospedeiro. Promastigotas são sensíveis à ação do complemento, mas não as amastigotas, as quais escapam da atividade fagocítica de neutrófilos, infectando macrófagos. Utilizam-se, para isso, de vias clássicas de interiorização de microorganismos dos macrófagos, penetrando nestas células, diferenciando-se em formas amastigotas, resistentes às enzimas digestivas da célula hospedeira e capazes de se multiplicar. O curso da infecção depende dos diversos mecanismos de modulação da resposta inata e da resposta imune (Von Stebut, 2007).

O preciso papel das células da resposta inata na infecção por *Leishmania spp* é pouco conhecido em modelos experimentais e em humanos. Macrófagos e células dendríticas são as mais estudadas neste contexto. Alguns estudos sugerem uma contribuição crítica da participação de leucócitos e interação com macrófagos na resposta imune (Ribeiro-Gomes et al., 2004), não havendo um consenso sobre a resultante desta participação, se no sentido da progressão ou da resistência à doença. A depleção de neutrófilos em camundongos susceptíveis Balb/c, mas não em resistentes C3H /HeJ resulta no agravamento da doença, aumento da produção de IL-4 e da carga parasitária (Chen et al., 2005). A análise de infiltrado celular de lesões cutâneas de pacientes com LTA revelou processo inflamatório, mesmo nos estágios finais da infecção. Os autores consideraram a hipótese de participação de neutrófilos também neste estágio (Morgado et al., 2008).

Em modelo murino de infecção por *Leishmania major*, com dose e via de inoculação simulando infecção natural, Belkaide et al. (2000b) identificaram duas fases distintas de resposta imune do hospedeiro. A primeira fase - silenciosa - tem a duração aproximada de quatro a cinco semanas. Nesta fase, ocorre fagocitose por macrófagos residentes, facilitada pela opsonização por componentes do complemento (C3bi, C3b e anticorpos naturais-IgG) e produção de citocinas inflamatórias. Há multiplicação de parasitos, sem sinais clínicos visíveis. A segunda fase inicia-se aproximadamente seis semanas após a infecção. É caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos para o sítio da infecção. Há presença de células dendríticas, migração de células T CD4+ e CD8+, citocinas, morte do parasito e aparecimento de sinais clínicos, com surgimento da lesão e posterior regressão. Mediadores derivados de mastócitos (Maurer et al., 2006), mecanismos mediados por IgG (Woelbing et al., 2006) e por

citocinas e quimiocinas (Sato et al., 2000) contribuem para o recrutamento de células dendríticas. Células dendríticas, células de Langerhans, e macrófagos são apresentadores de antígenos a linfócitos T e representam a ligação entre a resposta inata e a resposta adaptativa. Células dendríticas ativadas processam antígenos e migram para nódulos linfáticos, apresentando antígenos e produzindo citocinas fundamentais para ativação de células T. Estas células são as principais fontes de interleucina 12 (IL-12) principal citocina que induz resposta tipo Th1 e células T citotóxicas (CD8+) tipo um (Tc1). A ação coordenada deste sistema leva à eliminação de grande número de parasitos e à involução da lesão. Ao final, há produção de interleucina 10 (IL-10) e persistência de poucos parasitos identificados em células dendríticas com resolução da lesão (Jones et al., 1998; Castés & Tapia, 1998).

Resultados de diversos estudos apontam para a hipótese que a persistência de parasitos na lesão leve à manutenção de células T efectoras de memória local. A manutenção de parasitos inclui a ação de células T regulatórias (Treg), outra subpopulação de células T (Belkaid et al., 2006).

São descritos mais de um tipo de células Treg. As denominadas células Treg naturais são responsáveis pelo controle de processos infecciosos, limitando a magnitude de resposta de células T efectoras, resultando em controle adequado da infecção. Esta redução também pode ter lugar durante a fase ativa da doença impedindo danos excessivos aos tecidos. Contrariamente, o excessivo controle das células efectoras pelas células Treg pode levar ao desenvolvimento e multiplicação do parasito (Mendez et al., 2004; Belkaid et al., 2006). Um exemplo é a infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos, caracterizada pelo acúmulo de células Treg

locais modulando negativamente a atividade de células Th1 levando a expansão de parasitos no hospedeiro (Ji et al., 2005; Veras et al., 2006).

Pesquisas recentes em humanos corroboram a hipótese de que a resolução da lesão não está associada à eliminação de todos os parasitos (Schubach et al., 2001; Bittar et al., 2007). A presença de células Treg em lesões de pacientes humanos infectados por *L. (V.) braziliensis* foi demonstrada por Campanelli et al., (2006).

Em humanos, o conceito de dicotomia da resposta imune das leishmanioses, desenvolvido a partir do modelo citado anteriormente, vem sendo investigado ao longo dos anos. Embora não evidencie uma verdadeira dicotomia de resposta, a importância do balanço de citocinas tipo um ou tipo dois é aceita (Barral Netto et al., 1998; Coutinho et al., 1998; Pirmez et al., 1993; Rocha et al., 1999), ou seja, o sucesso no controle da infecção por protozoários intracelulares é obtido com resposta predominantemente tipo Th1, mas também com participação das do tipo Th2. Está bem estabelecido que IL-12 é importante para resposta protetora induzindo citocinas tipo Th1 e que IL-10 está associada à desativação de macrófagos. Na fase ativa da forma cutânea e cutaneomucosa observa-se um padrão misto de citocinas produzidas por células T com predomínio do tipo Th1 como interferon γ (IFN γ) e baixa detecção de IL-10. Em pacientes com LCD detectam-se altos níveis de IL-4, IL-10, (citocinas tipo Th2) e baixos níveis de IFN γ (citocina tipo Th1); células T CD4⁺ e CD8⁺ participam ativamente da resposta imune protetora em humanos (Barral Netto et al., 1998).

A participação de células B e de anticorpos na resposta imune a *Leishmania* é pouco conhecida. As investigações são em número relativamente pequeno se comparadas às realizadas com células T. A resposta a algumas questões básicas,

para o entendimento da funcionalidade destas células e de anticorpos específicos, ainda não é consenso entre os pesquisadores da área. A primeira questão importante diz respeito às fases iniciais da infecção, quando a opsonização do patógeno, *Leishmania*, por anticorpos pode ser importante para eficiência da resposta inata e protetora. As evidências para a importância destes mecanismos vêm de modelos experimentais de infecção com *Leishmania major* em camundongos pouco susceptíveis à leishmaniose, nos quais a depleção de células B reduz o número de células dendríticas infectadas tornando-os susceptíveis (Anderson et al., 2002; Woelbing et al., 2006). Considerando verdadeira esta hipótese, duas outras questões necessitam ser esclarecidas nas fases iniciais da infecção: a) a opsonização se faz apenas com anticorpos naturais IgG e IgM ou também com anticorpos específicos? b) Se houver participação de anticorpos específicos nesta fase, como se dá a ativação de células B sem a colaboração de células T ainda não ativadas? (Von Stebut, 2007). Outras investigações sugerem que a participação de linfócitos B contribui para o agravamento da doença. A expansão de células B em camundongos BALB.Xid, pouco susceptíveis a *Leishmania major* e geneticamente deficientes de células B, aumenta a susceptibilidade destes animais (Kima et al., 2000). Mais evidências vêm de alguns estudos experimentais com *L. (L.) amazonensis* (Colmenares et al., 2002; Wanasen et al., 2008). Por outro lado, há demonstrações experimentais da contribuição de células B para aquisição de resistência (Anderson et al., 2002; Miles et al., 2005). Além disso, alguns autores sugerem que a apresentação de antígenos por células B e funções mediadas por anticorpos não desempenham papel relevante na infecção por *Leishmania major* em camundongos (Brown & Reiner, 1999). As divergências entre estes resultados podem estar relacionados a diferenças entre os animais

estudados, dose de inóculo, via de inoculação e polimorfismo entre isolados de *Leishmania*, entre outras possibilidades (Teixeira et al., 2005; Matos et al., 2007). Estes dados em conjunto reforçam a necessidade de um maior número de investigações das funções de células B e anticorpos na resposta inata e na adquirida.

No curso da doença humana, há uma associação positiva observada entre gravidade da doença e detecção de anticorpos séricos. A produção de anticorpos específicos, independente da forma clínica, é predominantemente constituída por IgG. Não se observa correlação entre intensidade das respostas humoral e celular (Mendonça et al., 1986) , tanto “in vitro” (proliferação celular após estimulação com antígenos) quanto “in vivo” (IDRM). Ao contrário do que ocorre na leishmaniose visceral (LV), observa-se baixa ou moderada produção de anticorpos detectados por RIFI ou ELISA nos indivíduos com LC (Anthony et al., 1980; Guimarães et al., 1983). Níveis mais elevados de anticorpos são encontrados em pacientes com LM e LCM, apesar de existirem variações individuais. Na LCD, há geralmente detecção de altos níveis de anticorpos. Silveira et al., (2004) relataram títulos médios de IgG de 1: 20.480 na RIFI em pacientes com LCD. A redução de anticorpos séricos após a cura das lesões após terapia é referida por vários autores. A maioria se reporta à redução de títulos de anticorpos reagentes em RIFI; porém alguns observaram o desaparecimento destes títulos em poucos meses (Chiari et al., 1973a; Souza et al., 1982).

Quanto às demais classes de imunoglobulinas produzidas, a análise de amostras de soros de pacientes com LCM no início da infecção, demonstra baixa concentração de imunoglobulina A (IgA) anti-*Leishmania* (Labrada et al. 1989) e

níveis moderados de imunoglobulina M (IgM) nos dois primeiros meses de infecção (Guimarães et al., 1989; 1990; O'Neil et al., 1993).

A secreção de classes e subclasses de imunoglobulinas por células B é em parte dependente de citocinas produzidas por células T em resposta a estímulos antigênicos. Diferentes antígenos estimulam diferentemente a produção de determinadas classes e subclasses de imunoglobulinas (Walker et al., 1983; Schur, 1987). Antígenos T dependentes parecem induzir predominantemente a produção de IgG1 e IgG3, enquanto IgG2 é induzida por antígenos polissacarídicos como o LPS, encontrado na parede celular de certas bactérias. A persistência de estímulos antigênicos pode induzir resposta predominantemente de IgG4. Em indivíduos saudáveis, as subclasses de IgG, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 representam respectivamente, cerca de 65%, 24%, 7% e 4%. Todavia, nas diferentes infecções, esta proporcionalidade se encontra modificada. Nas diversas formas clínicas da leishmaniose, observa-se predominância de IgG1 específica, podendo haver alterações nas demais subclasses. IgG4 encontra-se elevada na LCD e em alguns casos de LV (Ulrich et al., 1995; Caldas et al., 2005). Na LCL e na LCM há prevalência de IgG1 seguida de IgG3 de IgG2, sendo IgG4 pouco prevalente (Rodriguez et al., 1996).

Investigações de subclasses de IgG com abordagens diagnósticas são desenvolvidas em soros de pacientes com LV do Velho Mundo com resultados de soroprevalência, sensibilidade e especificidade que parecem variar com a área geográfica (Elassad et al., 1994).

Apesar do grande número de investigações realizadas e da quantidade de informações atualmente disponíveis na literatura científica, existem grandes lacunas

a serem preenchidas, especialmente as que dizem respeito ao papel de células B e anticorpos produzidos durante a infecção por *Leishmania*.

2.4 DIAGNÓSTICO

2.4.1 Exames parasitológicos

O diagnóstico da doença humana considera critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Doenças dermatológicas com as quais a LTA pode ser confundida são, entre outras, sífilis, piodermites, esporotricose, cromomicose, tuberculose cutânea, e hanseníase (MS, 2006).

Os métodos parasitológicos são os mais indicados para o diagnóstico, constituindo-se no diagnóstico de certeza (Hepburn, 2000; MS, 2007). O exame direto é o mais empregado e consiste na visualização ao microscópio de formas amastigotas a partir de material de escarificação, aspirado de borda da lesão, ou impressão de fragmento de lesão, por aposição em lâmina corada pelo Giemsa. O exame é de baixo custo e fácil execução. Porém, apresenta baixa sensibilidade, principalmente, em lesões com longo tempo de evolução e em casos de infecção por *L. (V.) braziliensis*, caracterizados pela presença de baixo número de parasitos (Furtado, 1980; Mendonça et al., 1986; Hepburn, 2003).

O exame histopatológico, realizado a partir de fragmento de lesão excisado por biópsia, permite a visualização de parasitos em macrófagos e as características do processo e das células inflamatórias (Faber et al., 2003). As preparações podem ser analisadas por coloração com hematoxilina-eosina ou por colorações para análise imunohistoquímica. Nas duas situações a sensibilidade é baixa, com resultados descritos na literatura variando entre 14% e 80,3%. Como na maioria das

técnicas para comprovação de *Leishmania*, esta também produz melhores resultados quanto mais recente for a infecção (Mendonça et al., 1986; Weigle et al., 1987; Singh, 2006; Quintella et al., 2009;).

O isolamento do parasito de fragmento de lesão, semeado em meios de cultura apropriados, permite a visualização de formas promastigotas. A positividade é variável, podendo ocorrer contaminações que inviabilizam o crescimento de *Leishmania* sp. encontrando-se, na literatura, valores de sensibilidade em torno de 50% (Furtado, 1980). O isolamento por inoculação em animais, muito empregado no passado, não é atualmente indicado para a rotina diagnóstica (MS, 2007).

As técnicas de biologia molecular fundamentam-se na amplificação de moléculas de DNA do cinetoplasto dos parasitos presentes na amostra analisada. Atualmente, existe uma variedade de técnicas derivadas do mesmo princípio. Estes métodos, até o momento, são usados com finalidade de investigação e/ou de diagnóstico da LTA em centros de referência e instituições de pesquisa. Possuem boa acurácia, porém, são de custo elevado (Faber et al., 2003; Fagundes et al., 2007a; MS, 2007).

2.4.2 Métodos imunológicos

2.4.2.1 Intradermorreação de Montenegro

A IDRM avalia a resposta celular de hipersensibilidade tardia a antígeno de *Leishmania* inoculado por via intradérmica, sendo amplamente utilizada para diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos (Cuba-Cuba et al., 1985; Marzochi et al., 1980). A reação foi observada por Wagener (1923) com extratos de *Leishmania*

tropica e de *Leishmania donovani* em cobaios previamente imunizados. Em seguida, Montenegro (1926) obteve reações positivas com extratos de promastigotas da então denominada *L. braziliensis*. Ao longo dos anos, as preparações foram modificadas e avaliadas nas diversas regiões geográficas. No Brasil, atualmente, a rede pública distribui testes intradérmicos compostos por extrato semiparticulado de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/Br/1967/PH8), isolada de flebotomíneo (Fagundes, 2007b, c). Considera-se o teste positivo quando há formação de endureção superior a cinco milímetros, no local da aplicação, após 48 horas. A sensibilidade da reação próxima a 100% (Furtado, 1980; Mendonca et al., 1986) foi observada por diversos autores. Tem como desvantagens a possibilidade de resultados negativos até seis semanas de evolução da lesão e a impossibilidade de discriminar entre infecção ativa e doença pregressa. Além disso, resultados falsos positivos podem ocorrer devido a reações alérgicas ao preservante usado nas preparações antigênicas ou a reações cruzadas (de Lima Barros et al., 2005). Fagundes, (2007c) estudou indivíduos saudáveis de área não endêmica, para verificar a ocorrência de reações alérgicas a preservantes utilizados na preparação do antígeno. Os autores encontraram 9,2% de reatividade à salina mertiolatada, porém, não observaram reatividade à salina fenolada. Curiosamente, cerca de 30% dos indivíduos estudados foram reatores ao antígeno de *Leishmania*.

2.4.2.2 Testes sorológicos

Testes sorológicos são empregados para detecção de anticorpos específicos nas infecções por *Leishmania*, sendo indicados para diagnóstico nos casos de LVA (Badaró et al., 1983; Badaró et al., 1986; Kar, 1995). Todavia, a sua aplicação para o diagnóstico de LTA tem valor limitado, devido aos baixos níveis séricos de

imunoglobulinas específicas observados na maioria dos indivíduos infectados. Adicionalmente, observam-se com frequência reações cruzadas em amostras de indivíduos com esporotricose, malária, doença de Chagas, esquistossomose, hanseníase, tuberculose e sífilis (Bray and Lainson, 1967; Roffi et al., 1980).

Diferentes testes sorológicos podem ser empregados para detecção de anticorpos específicos anti-*Leishmania*, alguns dos quais caíram em desuso: reações de precipitação, imunodifusão, contraímunoeletroforese, reação de fixação de complemento e reações de aglutinação direta e indireta. Atualmente, a reação de imunofluorescência indireta, os ensaios enzimáticos (ELISA e dot-ELISA) e o “immunoblotting” vêm sendo empregados tanto para pesquisa quanto para diagnóstico (Hommel, 1976; Abdalla, 1977; Masuda et al., 1989; Ryan et al., 2002). A sensibilidade e a especificidade dos testes variam em função do método utilizado, da espécie de parasito envolvida e da preparação antigênica empregada, não havendo antígenos purificados com antigenicidade adequada para bons testes diagnósticos em larga escala.

Diversas técnicas de precipitação foram utilizadas para diagnóstico até a década de 70. Difusão em meio líquido (teste do anel) e diversas modalidades de imunodifusão em gel, como Ouchterlony e contraímunoeletroforese, foram padronizadas, analisadas e empregadas em estudos visando aplicabilidade no diagnóstico das leishmanioses. Estas técnicas são pouco usadas na atualidade por apresentarem resultados relativos à acurácia muito aquém dos necessários a bons testes diagnósticos. Além disso, quase sempre demandam muito tempo para sua execução e consomem quantidade relativamente grande de reagentes (Chang & Negherborn, 1947; Abdalla, 1977; Brener, 1957; Monjour et al., 1978).

A reação de aglutinação direta foi um dos primeiros testes sorológicos empregados para diagnóstico da leishmaniose. Em 1910, Jemma e Di Cristina, citados por Chaves em 1981, pesquisaram anticorpos aglutinantes em soro de crianças com LV visando diagnosticar a doença. Apesar dos insucessos dos primeiros estudos, ao longo das demais décadas, inúmeros trabalhos foram realizados com objetivo de estabelecer o diagnóstico sorológico com aglutinação direta (Noguchi, 1926; Auricchio, 1927; Cunha, 1938), culminando com a metodologia estabelecida por Allan e Kagan (1975), que empregaram formas promastigotas de *Leishmania* tratadas com tripsina e fixadas por formol. Nestes experimentos, os autores observaram reações com títulos mais elevados com o uso de parasitos homólogos. O tratamento enzimático de *Trypanosoma cruzi*, com a tripsina, desenvolvido anteriormente para diagnóstico da doença de Chagas por (Vattuone et al., 1973), resultou segundo os autores, em diminuição da reatividade inespecífica e da autoaglutinação até então observadas neste tipo de reação. Em 1986, Harith et al., introduziram no teste para diagnóstico de leishmanioses, o azul brilhante de Comassie, que permitiu visualização de reação em elevadas diluições aumentando a acurácia. O teste de aglutinação direta (DAT), assim modificado, tem-se mostrado apropriado para o diagnóstico de LVA, mas não para LTA, pois se consideram positivos títulos muito elevados objetivando eliminar possíveis resultados de reações cruzadas.

Reações de aglutinação indireta com antígenos solúveis adsorvidos em células, (hemácias de carneiro ou humanas) ou em partículas inertes (partículas de látex) também foram avaliadas pelo seu potencial diagnóstico para LT. Nestes diversos estudos ficou evidenciado o limitado valor diagnóstico para a LTA (Bray &

Lainson, 1967; Antunes et al., 1972; Mayrink et al., 1972; Al-Qadhi & Haroun, 1976; Menzel & Bienzle, 1978).

A reação de Fixação de Complemento (RFC), utilizada desde os primórdios das avaliações de testes com finalidade diagnóstica, foi muito usada em inquéritos sorológicos caninos no século passado. A RFC pode ser realizada com parasitos íntegros, antígenos particulados ou antígenos solúveis. Nesta técnica, empregou-se também antígeno de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) para o diagnóstico da LV (Cunha, 1938). Semelhante às técnicas citadas anteriormente, esta também é pouco adequada para diagnóstico da LTA (Aston and Thorley, 1970).

A RIFI foi usada inicialmente para diagnóstico das leishmanioses em 1963 por Oddo & Cascio. Fundamenta-se na identificação de anticorpos específicos, presentes na amostra, com o uso de parasitos íntegros formolizados e anti-imunoglobulina marcada com fluorocromo. Desde então, formas promastigotas ou amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* foram testadas como antígenos (Furtado, 1980; Guimarães et al., 1989; 1990; Guimarães & Celeste, 1991). Pela relativa facilidade de obtenção e maior sensibilidade (Bray & Lainson, 1965; Convit & Pinardi, 1969; Shaw & Lainson, 1977), as primeiras têm sido preferencialmente empregadas como antígeno. Soro e eluato de sangue, coletado em papel de filtro, podem ser analisados por esta técnica. O método tem como vantagem, em relação aos anteriores, o uso de uma quantidade muito pequena de reagente e maior sensibilidade. Tem como desvantagem o longo tempo empregado nas análises individuais de diferentes diluições para cada amostra, sendo de difícil automação. No Brasil, o teste para o diagnóstico de LV, disponível na rede pública de laboratórios, pode ser empregado para o diagnóstico da LTA, pelo fato das reações serem gênero específicas. Promastigotas homólogas crescidas em laboratórios de

pesquisas são também utilizadas como antígeno, na tentativa de aumentar a sensibilidade das reações. Os percentuais de sensibilidade e especificidade da RIFI encontrados na literatura variam entre 60% e 100% (Cuba Cuba et al., 1980; Marzochi et al., 1980). Geralmente, melhor acurácia é relatada para o diagnóstico de casos com comprometimento de mucosas, LM ou LCM e nas formas crônicas com maior tempo de evolução (Cuba Cuba et al., 1980; Barroso-Freitas et al., 2009).

A partir da década de 70, com a introdução dos ensaios enzimáticos, que possuem elevado grau de acurácia, tornou-se comum o uso do ELISA, técnica realizada com antígenos adsorvidos em suportes sólidos, principalmente em microplacas de material inerte (Hommel, 1978; Voller et al., 1976; 1978).

Os ensaios enzimáticos foram inicialmente descritos como ensaios homogêneos para moléculas de baixo peso molecular (Rubenstein et al., 1972; Voller & Bidwell, 1975; Voller et al, 1978) e em seguida modificados para ensaios heterogêneos, mais adequados para detecção de anticorpos em amostras de soros, com aplicação em doenças infecciosas. O fundamento do teste é semelhante ao da RIFI, diferenciando-se pelo tipo de marcador usado na anti-imunoglobulina, que neste caso é uma enzima. Com adição do substrato da enzima e de um cromógeno a reação pode ser visualizada a olho nu e a intensidade da reação medida por leitura de absorbância ou transmitância, em fotômetros ou espectrofotômetros.

O primeiro ensaio enzimático usado em grande escala teve por finalidade identificar anticorpos antivirais em uma investigação pós-vacinal (Voller & Bidwell, 1975). Atualmente estes testes são amplamente usados em diversas áreas de pesquisa e de diagnóstico (Voller et al., 1976; Voller, 1978; Badaró et al., 1993; Vidigal Cde et al., 2008; Barroso-Freitas et al., 2009). Isto se deve ao elevado limiar de detecção destas técnicas, resultando em maior sensibilidade, ao uso de

pequenas quantidades de reagentes, ao tempo de execução relativamente pequeno e, especialmente, à possibilidade de automação, permitindo a realização de grande número de testes em curto espaço de tempo.

O desempenho dos testes está estreitamente relacionado aos antígenos empregados, que podem ser particulados ou solúveis, purificados ou não e recombinantes (Badaró et al., 1986; 1993). Antígenos purificados e bem caracterizados apresentam maior probabilidade de elevar a especificidade, mas muitas vezes reduzem a sensibilidade do teste. As características dos anticorpos também podem ser relevantes para a melhoria dos parâmetros desejados nos ensaios. Por exemplo, sabe-se que o grau de avidéz e de afinidade dos anticorpos pelos antígenos interfere significativamente na sensibilidade e na especificidade das reações.

No sorodiagnóstico da LTA emprega-se, na maioria das vezes, o parasito íntegro ou extratos parasitários totais, investigando-se imunoglobulina total ou IgG específicas. Além disso, a acurácia dos testes pode variar também em função dos protocolos utilizados, do parasito infectante e da espécie usada como antígeno nos ensaios (Ulrich et al., 1988). Em trabalhos desenvolvidos por nosso grupo, em casuística do IPEC, encontramos valores de sensibilidade entre 95,7% e 97,4% e de especificidade entre 93,7%, e 97,4% (Barroso-Freitas et al., 2009; Ulrich et al., 1988).

Outra técnica de importância para o sorodiagnóstico da LTA é o “immunoblotting”, que pode ser usado tanto para a detecção de anticorpos específicos, quanto para identificação e caracterização de antígenos de *Leishmania* reconhecidos por soros de indivíduos infectados. Desta forma, é possível identificar um padrão de reconhecimento de moléculas ou de grupos de moléculas por

amostras de soros, quando se utiliza extratos antigênicos ou frações parcialmente purificadas. Para diversas doenças infecciosas, os “kits” diagnósticos por “immunoblotting” são produzidos com proteínas purificadas ou antígenos recombinantes e previamente transferidos para papel de nitrocelulose (Roffi et al., 1980; Soto et al., 1996 ; Goncalves et al., 2002). No caso da LTA, o teste com antígenos totais, produtos liberados em meios de cultura (Mouta-Confort, 1991), proteínas e glicoproteínas purificadas ou recombinantes (gp 63; GBP; HSP 60; T26-U2 e T26-U4) têm sido objeto de pesquisas (Bouvier et al., 1985; Montoya et al., 1990; 1993; Jensen et al., 1996; Rey-Ladino et al., 1997). O seu emprego está restrito à instituições de pesquisa podendo ser empregada como técnica confirmatória, não se aplicando à triagem, devido à dificuldades operacionais.

Até o momento não se dispõe de antígenos purificados ou recombinantes com eficácia comprovada para o diagnóstico de LTA, nem de “kit” comercial com antígeno de qualquer natureza para ensaios com amostras de origem humana.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o ELISA usando extrato parasitário parcialmente solúvel de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* para detecção de IgG anti-*Leishmania* em amostras de soros obtidas de pacientes encaminhados para diagnóstico de LTA.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a sensibilidade, especificidade e valores preditivos, positivo e negativo, do ELISA para o diagnóstico de LTA considerando-se padrão ouro a positividade em um dos exames parasitológicos ou exame molecular, PCR.
- Comparar os resultados do ELISA com cada um dos seguintes exames: IDRM, PCR, exame direto, histopatologia e isolamento em cultura.
- Investigar possíveis associações entre resposta humoral por IgG e resposta terapêutica imediata e tardia, até dois anos após o tratamento.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo transversal de avaliação do ELISA como técnica para diagnóstico e longitudinal para acompanhamento pós-terapêutico de pacientes com LTA durante um período de dois anos. Comparou-se este ensaio com exames parasitológicos (exame direto, histopatologia e isolamento em cultura) e PCR, que em conjunto constituem padrão de referência neste diagnóstico, além da IDRM.

4.1.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC (CEP/IPEC) e aprovado com o número 0032.0.009.000-07 (Anexo I). A rotina clínica de atendimento dos pacientes foi previamente submetida ao CEP/IPEC, constituindo o projeto: “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – FIOCRUZ”, aprovado no CEP/IPEC com o número 0016.0.009-02 (Anexo II). Os indivíduos foram esclarecidos quanto aos objetivos gerais do estudo e à utilização de suas amostras de soros solicitando-se consentimento para o emprego das mesmas, através da assinatura de um termo de consentimento esclarecido (Anexo III) e o compromisso de confidencialidade foi assumido e assinado pela autora (Anexo IV).

4.1.2 Grupos de estudo

O estudo transversal, de avaliação diagnóstica, incluiu amostras de pacientes de áreas endêmicas de LTA atendidos no IPEC - FIOCRUZ, Rio de Janeiro - Brasil, entre março de 2005 e março de 2006. De acordo com a apresentação clínica, o diagnóstico parasitológico e a evolução clínica dos pacientes, as amostras foram agrupadas da seguinte forma:

grupo I (LTA) - amostras de 150 pacientes com diagnóstico confirmado de LTA por pelo menos um exame parasitológico ou PCR. Neste grupo 132 pacientes apresentavam lesões ulceradas em pele (LC) e 18 tinham comprometimento mucoso ou cutaneomucoso. Para efeito do estudo estas apresentações clínicas (mucosas e cutaneomucosas) foram analisadas em conjunto como LCM;

grupo II (controles) - amostras de 103 pacientes suspeitos de LTA, submetidos ao mesmo protocolo de investigação clínica com resultados negativos para LTA e confirmação de outro diagnóstico clínico.

Para o estudo longitudinal de avaliação da resposta terapêutica tardia até dois anos, os pacientes do grupo I (LTA) foram reagrupados em:

subgrupo Cura Terapêutica (ICT) - amostras de 75 pacientes que mantiveram as lesões cicatrizadas durante o período de acompanhamento pós-tratamento;

subgrupo Recidiva Pós-Terapêutica (IRT) - amostras de 30 pacientes que apresentaram recidiva das lesões durante o período de acompanhamento pós-tratamento. Estes pacientes podem ter realizado mais de um tratamento e nesse caso as amostras foram coletadas antes, durante e após cada um deles: o tratamento inicial (IRT1), o segundo tratamento (IRT2) ou o terceiro tratamento (IRT3).

Definiu-se reativação como o reaparecimento de sinais de atividade da lesão (ulceração, eritema, infiltração, descamação e/ou crostas) após o tratamento.

O tratamento dos pacientes com a forma cutânea foi realizado preferencialmente com trinta aplicações intramusculares de antimoniato de meglumina na dose de cinco miligramas de antimônio pentavalente por quilograma de peso por dia. Os pacientes com a forma mucosa foram tratados da mesma forma até a epitelização total e desinfiltração das lesões (geralmente entre 30 e 60 aplicações). Alternativamente, na forma cutânea, o antimoniato de meglumina pode ter sido utilizado por via intralesional. Como droga de segunda linha foi utilizada anfotericina B.

4.1.3 Critérios de elegibilidade

Foram incluídos no estudo pacientes com suspeita de LTA submetidos ao protocolo do Vigileish para atendimento e investigação diagnóstica no período de março de 2005 a março de 2006 (Bossuyt et al., 2003).

Foram excluídos do estudo de acompanhamento pacientes do *grupo I* com número de coletas inferior a quatro.

4.1.4 Tamanho amostral e coleta

Para determinação da acurácia estimou-se um número mínimo de 158 amostras (79 LTA e 79 controles) com erro α de 0,5% e poder de 80%, para detectar uma diferença de ao menos 6%, tomando como base a sensibilidade de 90% obtida

em trabalho anterior (valor compreendido no intervalo de confiança de 95%) (Barroso-Freitas et al., 2009).

Amostras para comparação da sensibilidade do ELISA com a de métodos parasitológicos, PCR e IDRM foram estimadas para comparação de proporções, considerando-se valores médios de sensibilidade das técnicas obtidos na literatura admitindo intervalo de confiança de 95% e um poder de 80% (Pagano & Kimberlee, 2004). Estimou-se 99% para PCR e IDRM (Faber et al., 2003; Furtado, 1980), 50% para isolamento em cultura, para exame histopatológico e para o exame direto (Furtado, 1980; Romero et al., 2001). Os tamanhos mínimos amostrais para comparações do ELISA com outras técnicas diagnósticas foram calculados em: 194 amostras para comparação com PCR e IDRM, 34 amostras para comparação com o isolamento em cultura, com o exame histopatológico e com o exame direto.

As amostras foram obtidas por coletas de sangue periférico, de acordo com o protocolo de atendimento de pacientes com LTA e coletadas na primeira consulta e após o tratamento: imediatamente após o final do tratamento; um mês, três meses, seis meses, um e dois anos após o tratamento; separadas em alíquotas e conservadas em freezer a -20°C no Vigileish.

As informações de avaliação clínica, dermatológica e otorrinolaringológica das variáveis de interesse para o estudo foram obtidas dos prontuários.

4.2 REALIZAÇÃO DOS TESTES SOROLÓGICOS

4.2.1 Antígenos

O antígeno para uso em todos os ensaios foi produzido a partir de formas promastigotas de *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), expandidas em meio

BHI (Brain Heart Infusion-Difco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB), 200 U/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina e 1% de urina humana (Madeira et al., 2009). Os parasitos foram coletados em fase estacionária de crescimento e lavados três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 a 3000g a 4°C (Centrífuga Refrigerada Coulter Allegra 21R-Beckman). Após a última lavagem, a massa parasitária foi ressuspensa em tampão de lise, contendo inibidores de protease (1 mM iodoacetamina, 1mM fenilmetilsulfonilfluorídrico e 1mM fenantrolina) e submetida a ultra-som (Transonic 310, Elma®, Durhan, NC, USA) para o rompimento total dos parasitos. A suspensão foi novamente centrifugada a 10.000g 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e o seu teor de proteína dosado pelo método de Folin Lowry (micro-Lowry total protein determination kit, Peterson's modification; Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). O antígeno foi separado em alíquotas e conservado a -20 °C até o momento do uso.

4.2.2 ELISA

4.2.2.1 Realização do teste

Cada amostra foi analisada em dois momentos distintos, de forma mascarada, pelo mesmo técnico. O teste foi realizado como descrito em Barroso-Freitas et al., 2009, resumido a seguir. Para controle da reação, em todos os ELISA, foram empregadas três amostras de soros reatores de pacientes comprovadamente com LTA e três não reatoras de indivíduos saudáveis.

Placas de poliestireno (nº de catálogo 439454, Nunc Maxisorp, Nalgene Nunc International, Rochester, MN) foram sensibilizadas com 100 µL de solução antigênica em concentração de 7.5 µg/mL, diluída em tampão carbonato-bicarbonato

a 0,06M e pH 9,6 e incubadas durante a noite a 4°C. Seguiram-se quatro lavagens com PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (PBS-T), em lavadora automática (Tecan – Columbus Washer®). Das amostras de soro diluídas a 1:40 em solução 1% leite desnatado (Molico®) em PBS 0,01M pH 7,2 Tween 20 a 0,05% (PBS-T-L), foram adicionados 100 µL em cada poço, incubando-se por 45 minutos a 37°C em câmara úmida. Após quatro novas lavagens, foram adicionados 100µL de anti-IgG conjugada à peroxidase diluída em PBS-T-L em cada poço. A diluição do conjugado usada no teste foi estabelecida através de titulação prévia. As etapas de lavagem dos poços das placas foram realizadas com PBS Tween 20 a 0,5% e as incubações com os reagentes foram de 45 minutos a 37°C. A reação foi revelada utilizando-se 3.3'.5.5'-tetrametilbenzidina (TMB) e a densidade óptica (DO) determinada em absorbância em espectrofotômetro de placa de ELISA (Tecan - Genius®).

4.2.3 Comparação de ELISA com IDRM, PCR e métodos parasitológicos

As amostras de sangue foram obtidas antes do tratamento e os dados clínicos e resultados de exames a partir de prontuários. Comparou-se o ELISA com a IDRM e com cada um dos métodos parasitológicos (exame direto, histopatológico e cultura) e PCR. Na rotina do Vigileish a PCR e IDRM são sumarizados a seguir:

Investigou-se DNA do parasito em lesão pela PCR usando-se o “primer” para região conservada de kDNA do gênero *Leishmania* (5'-(G/C)(G/C)(C/G)CC(A/C)-CTAT(A/T)TTACACCAACCCC e 5'-GGGGAGGGG-CGTTCTGCGAA) produto de 120 pares de bases, protocolo “Hot Start”, enzima Amplitaq Gold (Pirmez et al., 1999; Schubach et al., 2001; Fagundes et al., 2007b).

Na IDRM empregou-se o antígeno produzido pelo Centro de Produção e Pesquisas de Imunobiológicos do Paraná, 40 µg /mL *Leishmania amazonensis* cepa IFLA/BR/1967/ PH8 contendo 40 µg /mL de nitrogênio proteico preservado em 0,4% de fenol (Fagundes et al., 2007a).

O exame direto foi realizado a partir de material obtido por esfregaço em lâmina de escarificado da borda da lesão ou de aposição em lâmina de fragmento de biópsia, ambos corados pelo Giemsa.

Os exames histopatológicos foram analisados após coloração de lâminas com seções de blocos de tecidos embebidos em parafinas e corados pela hematoxilina e eosina.

O isolamento de *Leishmania* foi obtido a partir de fragmentos de biópsia das lesões como descrito em Madeira et al. (2009). Após imersão do fragmento em salina contendo antibióticos e antifúngicos por 24 horas a 4 °C, o espécime foi transferido para meio de cultura bifásico Novy-MacNeal-Nicolle suplementado com meio de cultura de Schneider e SFB a 10%. Os cultivos foram semanalmente observados para evidenciar crescimento num período máximo de 30 dias.

4.2.4 Associação de ELISA e IDRM para diagnóstico

Realizou-se também análise do uso combinado do ELISA e da IDRM em 242 pacientes (142 do *grupo I* e 100 do *grupo II*) com a finalidade de investigar se a associação dos métodos produz resultados com valor diagnóstico mais preciso que usados isoladamente. Avaliou-se a associação dos métodos em paralelo, quando se procede à análise nos dois testes considerando-se como resultado a positividade em um deles, e em série quando um dos métodos é usado como triagem e o outro como confirmatório de resultados positivos.

4.3. ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.3.1 Variáveis de interesse

As variáveis consideradas foram sexo, pesquisa de *Leishmania* pelo exame direto, pesquisa de *Leishmania* pelo exame histopatológico, isolamento em cultura e PCR; intradermoreação de Montenegro, forma clínica da doença, tempo de evolução da LTA em dias, exames diretos com colorações especiais e inoculação em meios de cultura para fungos e micobactérias, resposta ao tratamento, número de lesões, tamanho das lesões em milímetro, resultado de testes expres em unidade arbitrada (UA)

4.3.2 Análise estatística

As análises foram realizadas considerando-se o intervalo de confiança de 95% (IC=95%) empregando-se os programas estatísticos Statistical Package for the Social Science versão 11.0 (Inc., Chicago,IL, USA) e MedCalc 8.2 (Mariakerke, Belgium).

A confiabilidade foi avaliada pelo coeficiente de correlação intraclassa (ICC) onde valores próximos a um indicam uma boa reprodutibilidade.

A linha de corte (“cut-off”) do ELISA foi estabelecida no ponto de maior sensibilidade e especificidade da curva “Receiver Operating Characteristic” (ROC), considerando-se os grupos I (no momento do diagnóstico) e II. A área sob a curva (AUC), cujo valor máximo é um, indica um bom desempenho do teste.

Os resultados são representados por Unidade Arbitrada (UA) calculada como o resultado da divisão entre a leitura de DO de cada uma das amostras e “cut-off”

($UA = DO \text{ amostra} / \text{'cut-off'}$), cujo valor superior a um corresponde a resultado positivo. Consequentemente a UA igual a um corresponde ao "cut-off". Alternativamente analisou-se o valor de UA superior a dois ($UA > 2$) como um possível "cut-off" em função da obtenção de valores elevados encontrados em amostras no estudo de acompanhamento após o tratamento.

Os parâmetros de acurácia, sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razões de verossimilhança foram calculados com o auxílio do MedCalc 8.2.

As comparações entre as variáveis contínuas segundo as leituras de DO e unidades arbitradas entre os grupos foram realizadas pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney para amostras independentes e Wilcoxon para grupos relacionados (comparações de unidades arbitradas intra-grupos no acompanhamento das amostras). As análises foram conduzidas comparando-se a reatividade das amostras dos pacientes do *grupo I* no momento do diagnóstico e nos demais tempos estabelecidos. Investigaram-se possíveis diferenças intragrupos e intergrupos nas amostras daqueles pacientes que mantiveram as lesões cicatrizadas (*subgrupo ICT*) com aquelas de pacientes cujas lesões reativaram durante o período do estudo (*subgrupo IRT*).

Comparações de proporções de sensibilidade entre o ELISA e os outros métodos diagnósticos foram realizadas pelo teste Qui-quadrado com o auxílio do MedCalc 8.2.

Para as correlações entre as leituras de DO número de lesões e idade usou-se o coeficiente de correlação de Spearman.

5 RESULTADOS

Foram analisadas 780 amostras de soros de 253 pacientes, 110 (43,4%) mulheres e 143 (56,6%) homens com idade entre 4 e 91 anos ($38,8 \pm 19,7$ anos). Entre os casos 92 (61,3%) eram homens e 58 (38,7%) mulheres.

As informações obtidas de prontuários dos pacientes, relativas ao diagnóstico parasitológico e frequência dos diagnósticos observados no grupo *controle (II)* encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 Grupos do estudo para determinação da acurácia do ELISA.

<i>Grupos</i>	<i>N</i>	<i>Subtotal</i>
<i>Grupo I</i>	<i>LTA confirmada parasitologicamente</i>	<i>150</i>
	<i>LC</i>	<i>132</i>
	<i>LCM</i>	<i>18</i>
<i>Grupo II</i>	<i>Controle (outro diagnóstico confirmado)</i>	<i>103</i>
	<i>Esporotricose</i>	<i>44</i>
	<i>Infecções bacterianas</i>	<i>19</i>
	<i>Úlceras de estase</i>	<i>19</i>
	<i>Carcinomas</i>	<i>5</i>
	<i>Outros</i>	<i>16</i>
<i>Total</i>	<i>103</i>	<i>253</i>

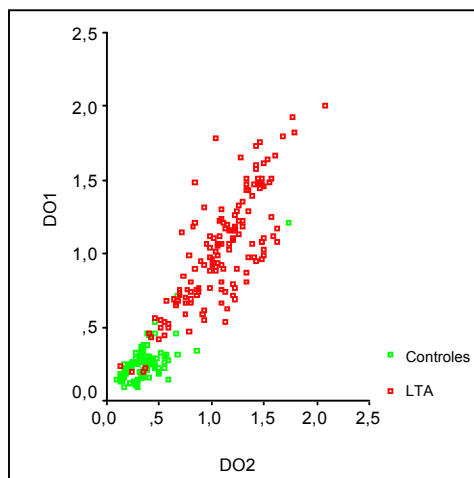
LTA, leishmaniose tegumentar americana; LC, leishmaniose cutânea; LCM, leishmaniose cutaneomucosa

5.1 ELISA

5.1.1 Confiabilidade

A repetibilidade do ELISA, aferida em duas análises independentes, foi avaliada pelo coeficiente de correlação intraclassa (ICC) obtendo-se o valor 0,953, IC 95%= (0,939 - 0,963) considerado excelente (Gráfico 1).

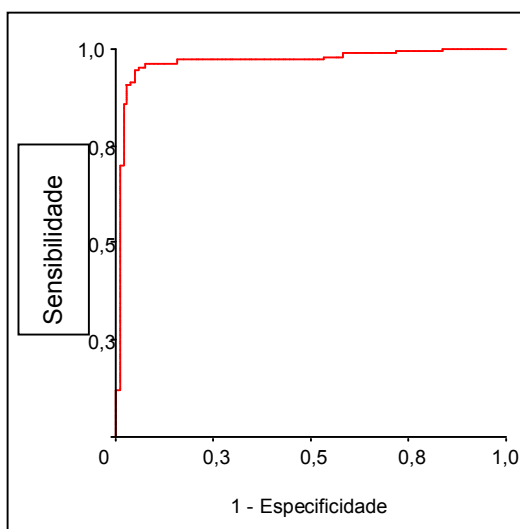
Gráfico 1. Confiabilidade do ELISA, leitura de densidade óptica (DO) em duas análises, estimado pelo coeficiente de correlação intraclass 0,953 Intervalo de confiança de 95% (0,939 - 0,963).



5.1.2 Acurácia

A definição dos soros reatores foi estabelecida pela linha de corte (*cut-off*) de 0,497, obtida na curva ROC com a leitura de DO das amostras. A área sob a curva foi 0,967 (Intervalo de confiança de 95% = 0,943 a 0,992; gráfico 2).

Gráfico 2. Área sob a curva ROC obtida com o ELISA, 0,967 (Intervalo de confiança de 95% = 0,943 a 0,992).



Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e razão de verossimilhança negativa (RVN) com base na análise dos resultados dos grupos LTA e controles estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN), razão de verossimilhança positiva (RVP) e negativa (RVN), intervalo de confiança (IC).

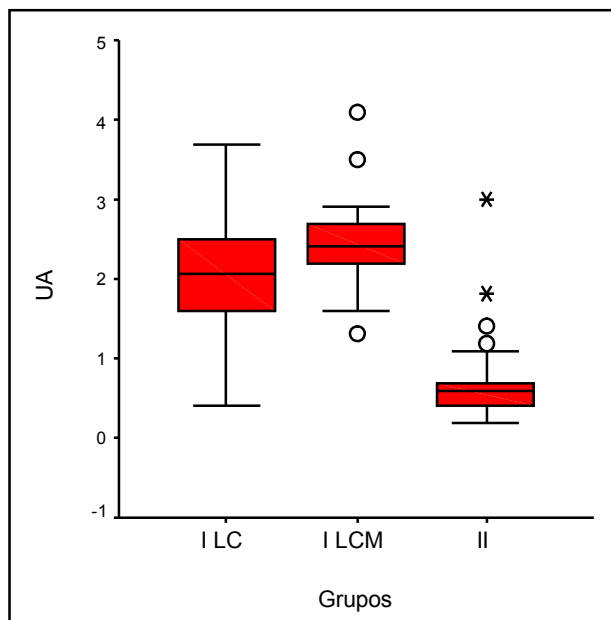
<i>Parâmetros de acurácia</i>	<i>%</i>	<i>IC (95%)</i>
<i>Sensibilidade</i>	<i>94,7</i>	<i>89,8- 97,7</i>
<i>Especificidade</i>	<i>95,1</i>	<i>88,9- 98,4</i>
<i>VPP</i>	<i>96,6</i>	<i>91,1 - 98,6</i>
<i>VPN</i>	<i>92,4</i>	<i>89,7 - 98,7</i>
<i>RVP</i>	<i>19,31</i>	
<i>RVN</i>	<i>0,06</i>	

5.1.3 Correlações

Média, desvio padrão e mediana da UA de DO obtidos com o *grupo I* foram respectivamente 1,057 ($\pm 0,343$), e 2,1 e com o *grupo II* respectivamente, 0,312 ($\pm 0,169$) e 0,6. As medianas das UA dos *grupos I e II* diferiram entre si com significância estatística (p-valor<0.0001).

A média de leitura de DO e mediana das UA foram mais elevadas nas amostras de pacientes com LCM que com LC. A diferença entre as medianas das UA destes grupos apresentou significância estatística (Mann-Whitney; p-valor <0,05) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Distribuição dos valores de unidades arbitradas (UA) obtidas no ELISA com amostras dos grupos I (LC-leishmaniose cutânea e LCM - leishmaniose cutâneo-mucosa) e II (controles).



Os demais resultados relativos às médias de leituras de DO, desvios padrão e medianas da UA no ELISA dos grupos e subgrupos estão apresentados na tabela 3. Diferente das amostras de pacientes com LC, todas as amostras de pacientes com LCM foram reatoras ao ELISA.

No *grupo I*, foram observadas correlações positivas fracas, obtidas pelo coeficiente de correlação de postos de Spearman, entre a intensidade de reação representada pela UA e as formas clínicas, ($r = 0,196$ p-valor<0,05), o número de lesões ($r = 0,268$, p-valor=0,001), diâmetro das lesões ($r = 0,207$ p-valor<0,05).

Não se observou correlação entre UA e diâmetro da IDRm e tempo de evolução em meses. No *grupo II*, as reações inespecíficas ocorreram em cinco pacientes com os seguintes diagnósticos: esporotricose (2), piodermite (1), carcinoma (1) e úlcera vascular (1).

Tabela 3. Médias de densidade óptica (DO), desvio padrão (dp) e medianas das unidades arbitradas (UA) obtidas no ELISA com as amostras analisadas. (LTA) leishmaniose tegumentar americana, (LC) leishmaniose cutânea, (LCM) leishmaniose cutaneomucosa.

<i>Grupos</i>	<i>Subtotal</i>	<i>Média de DO</i>	<i>dp</i>	<i>Mediana das UA</i>
<i>Grupo I LTA</i>	<i>N</i>	<i>150</i>	<i>1,057±0,343</i>	<i>2,1</i>
<i>LC</i>	<i>132</i>	<i>1,03 ±0,34</i>		<i>2,03</i>
<i>LCM</i>	<i>18</i>	<i>1,253±0,304</i>		<i>2,4</i>
<i>Grupo II Controle</i>	<i>103</i>	<i>0,312±0,169</i>		<i>0,6</i>
<i>Esporotricose</i>	<i>44</i>	<i>0,306±0,106</i>		<i>0,6</i>
<i>Infecções bacterianas</i>	<i>19</i>	<i>0,314±0,18</i>		<i>0,6</i>
<i>Úlcera de estase</i>	<i>19</i>	<i>0,318±0,298</i>		<i>0,4</i>
<i>Carcinomas</i>	<i>5</i>	<i>0,394±0,174</i>		<i>0,7</i>
<i>Outros</i>	<i>16</i>	<i>0,297±0,07</i>		<i>0,6</i>
<i>Total</i>	<i>253</i>	<i>0,754±0,464</i>		<i>1,5</i>

5.2. COMPARAÇÃO DE ELISA COM IDRM, PCR E MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

A sensibilidade do ELISA foi comparada com a de cada uma das demais técnicas diagnósticas (dados obtidos dos prontuários) pelo teste Qui-quadrado (gráfico 4).

Não foram observadas diferenças com significância estatística entre a sensibilidade do ELISA e da PCR ou da IDRM, o mesmo não ocorrendo na comparação com outros métodos (tabela 4). Os pacientes não reatores à IDRM tinham até 3 meses de evolução das lesões. Nestes mesmos pacientes o ELISA foi

reator. Entre os controles observou-se reatividade da IDRМ em 37 (37%) indivíduos. Quinze deles receberam o diagnóstico de esporotricose.

Gráfico 4. Comparação entre as sensibilidades do ELISA, IDRМ, PCR e métodos parasitológicos.

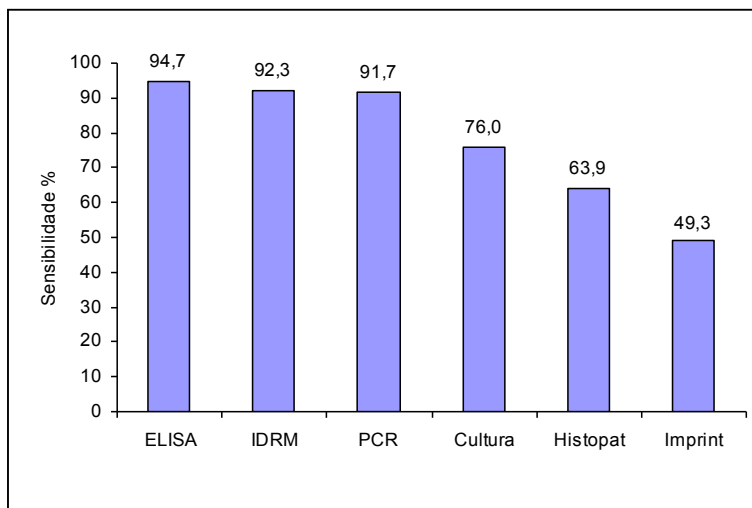


Tabela 4. Comparação entre a sensibilidade do ELISA e IDRМ, PCR e métodos parasitológicos.

Método	Nº amostras	Nº reatores	Sensibilidade %	p-valor
ELISA*	150	142	94,7	
IDRM	142	131	92,3	0,575
PCR	144	132	91,7	0,454
Cultura	146	111	76	<0,0001
Histopatológico	144	92	63,9	<0,0001
Exame direto	142	70	49,3	<0,0001

*grupo de comparação em teste Qui-quadrado

Os valores de concordância corrigida *Kappa* de 0,492 e 0,542 foram obtidos na comparação dos resultados do ELISA com PCR e da IDRМ respectivamente (Tabelas 5 e 6). Observou-se maior concordância de resultados positivos do ELISA com a PCR 79,1%, com a IDRМ a concordância foi de 52,9%.

Tabela 5. Concordância de resultados do ELISA com IDRM.

		IDRM		Total
		Reator	Não reator	
ELISA	Reator	128 ^a	12	140
	Não reator	40	62 ^b	102
Total		168	74	242

a concordância de resultados positivos 52,9%

b concordância de resultados negativos 25,6%

Tabela 6. Concordância de resultados do ELISA com PCR.

		PCR		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA	Reator	125 ^a	12	137
	Não reator	8	13	21
Total		133	25 ^b	158

a - concordância de resultados positivos 79,1%

b- concordância de resultados negativos 8,2%

5.3. ASSOCIAÇÃO DOS MÉTODOS ELISA E IDRM PARA O DIAGNÓSTICO

A associação de métodos é uma estratégia comum, visando à melhoria da sensibilidade e da especificidade para o diagnóstico. O uso do ELISA e IDRM em paralelo, quando o resultado positivo em uma das técnicas é considerado para o diagnóstico, resultou em sensibilidade de 99,2%, porém a especificidade foi da ordem de 61%. Com o uso em série, quando são considerados apenas os resultados positivos em ambas, encontrou-se 88,0 % de sensibilidade e 98,0% de especificidade. Os valores preditivos positivos e negativos também foram elevados (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados de associações do ELISA e da IDRM em paralelo e em série com os respectivos desvios padrão para o diagnóstico de LTA.

	<i>Testes em paralelo</i>	<i>IC 95%</i>	<i>Testes em série</i>	<i>IC 95%</i>
<i>Sensibilidade %</i>	99,2	(95,6 - 100)	88	(81,2 - 92,7)
<i>Especificidade %</i>	61	(50,7 - 70,4)	98	(92,3 - 99,7)
<i>VPP %</i>	78,3	(71,5 - 84,0)	98,4	(93,3 - 99,7)
<i>VPN %</i>	98,4	(90,2 - 99,9)	85,2	(77,1 - 90,9)

5.4 . AVALIAÇÃO DO ELISA NO CONTROLE PÓS-TRATAMENTO DE PACIENTES COM LTA

O monitoramento de IgG por ELISA até dois anos após o tratamento foi realizado em 720 amostras de 106 pacientes do *grupo I* que preencheram os critérios de inclusão.

O *subgrupo ICT* foi constituído por amostras de 75 (70,7%) pacientes que se mantiveram curados durante o período de seguimento. O *subgrupo IRT* foi constituído por 31 pacientes (29,2%) nos quais ocorreu reativação das lesões. Em nove deles (8,5%) houve mais de uma reativação. Estes *subgrupos (ICT e IRT)*, foram constituídos para avaliação de resposta terapêutica incluindo-se nas análises amostras de pacientes independente da forma clínica, exceto quando especificado análises em separado. As 103 amostras do grupo controle – *grupo II* foram coletadas apenas no momento do diagnóstico. A distribuição dos pacientes, o número de amostras analisadas e a mediana das unidades arbitradas obtidas no ELISA encontram-se na tabela 8. Como citado, o “cut-off” corresponde à UA igual a um (UA =1) porém em função dos elevados valores de UA observados *no grupo IRT* os resultados foram também analisados com base em UA maior que dois (UA>2).

Tabela 8. Número de pacientes, de amostras analisadas e mediana das unidades arbitradas (UA) do ELISA. Grupos: ICT – amostras de pacientes com cura após tratamento; grupo IRT – amostras de pacientes com reativação da lesão após tratamento. Med- mediana; IIQ- intervalo interquartil.

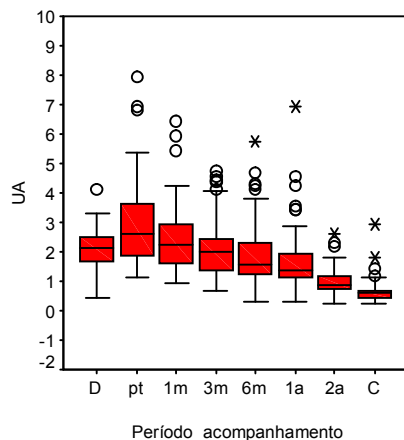
Grupos e Subgrupos	N pacientes	N amostras	Med (IIQ)
<i>LTA</i>			
Subgrupo I CT* - cicatrização	75	441	1, 840 (1,289)
Grupo IRT*- reativação	31	279	2,739 (1,910)
Subtotal	106	720	2,115 (1,627)
Controles	103	103	0,609 (0,299)
Total	209	823	1,864 (1,797)

* Mann-Whitney; p-valor<0,0001.

5.4.1 Acompanhamento sorológico por ELISA no subgrupo I CT - pacientes com lesões cicatrizadas até dois anos pós-tratamento.

Os níveis de IgG, representados pela UA, obtidos com as 441 amostras analisadas neste subgrupo, foram mais elevados no momento do diagnóstico e logo após o tratamento, havendo redução gradual ao longo de dois anos de acompanhamento (Gráfico 5). A reatividade individual das amostras no ELISA de pacientes sem reativação não foi homogênea. Contudo, no período imediatamente após o tratamento, as medianas das UA observadas foram significativamente mais elevadas que no momento de diagnóstico (Wilcoxon, p-valor <0, 0001 e 0, 022) e um mês após o tratamento. Inversamente, a partir de seis meses após o tratamento, encontraram-se medianas com valores inferiores às do momento diagnóstico (Wilcoxon; p-valor<0,016), (Tabela 9).

Gráfico 5. Distribuição dos valores de unidades arbitradas (UA) de IgG do ELISA no grupo com cura até dois anos após tratamento (subgrupo grupo ICT) avaliados: no diagnóstico (D), imediatamente após tratamento (pt) 1mês (1m), 3 meses (3m), 6 meses (6m), 1 ano (1a) e 2 anos (2a) após o tratamento e nos (C) controles.



A frequência de soros positivos, inicialmente de 97,3%, também foi gradualmente reduzindo até alcançar 47,2% ao final de dois anos de acompanhamento (Tabela 9).

Tabela 9. Comparação das medianas (med) das unidades arbitradas obtidas com as amostras do subgrupo I CT (cura após tratamento) no período avaliado.

Período	% reatores	Nº de reatores /N	Med das UA	p valor
Diagnóstico*	97,3	(73/75)	2,147	
Final tratamento	100	(50/50)	2,62	<0,0001
1 mês	96,9	(62/64)	2,261	0,022
3 meses	83,3	(57/66)	1,978	0,348
6 meses	88,6	(62/70)	1,58	0,016
1 ano	82	(50/61)	1,388	<0,0001
2 anos	47,2	(26/55)	0,884	<0,0001
Total	86,2	(381/441)	1,84	

*Grupo de comparação em teste Wilcoxon

Dois pacientes apresentavam amostras não reativas ao ELISA no momento do diagnóstico: um deles se manteve sem reatividade durante o período acompanhado, neste caso até um ano de acompanhamento, porém, o outro se tornou reator fraco com leituras de DO próximas ao “cut-off” perdendo a reatividade aos dois anos após o tratamento.

Níveis mais elevados de IgG, em amostras com UA superior a dois (duas vezes o “cut-off”), foram encontrados apenas em 15,3% (4/26) das amostras reatoras representando 6,8% (4/59) do total deste subgrupo ao final de dois anos de acompanhamento.

5.4.2 Acompanhamento sorológico por ELISA no subgrupo I RT - pacientes com reativações até dois anos pós-tratamento.

No subgrupo IRT foram estudadas 279 amostras de 31 pacientes com reativação das lesões após o tratamento, dos quais oito reativaram mais de uma vez. Os valores das medianas das unidades arbitradas no ELISA das amostras do subgrupo IRT analisadas em conjunto e a significância estatística estão apresentadas na tabela 10.

Tabela 10. Medianas (med) das unidades arbitradas (UA) no ELISA das amostras de pacientes com reativação coletadas antes e após tratamento.

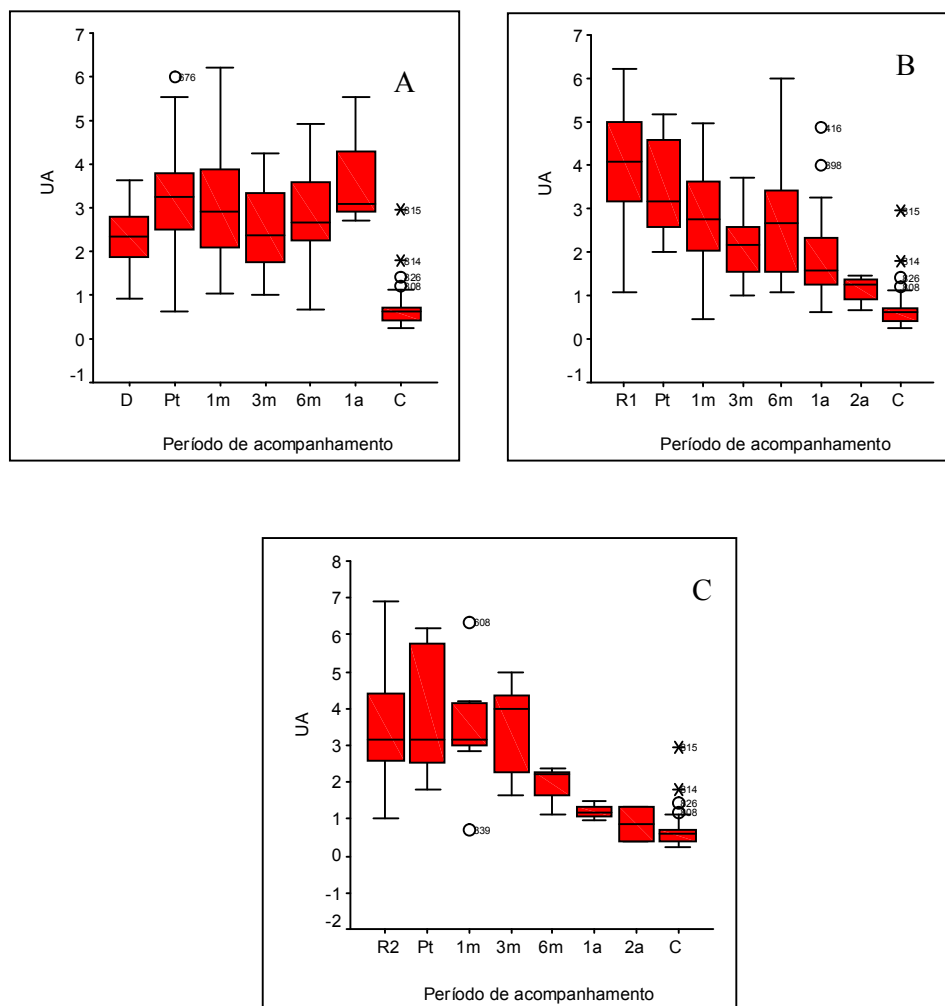
<i>IRT</i>	<i>N</i>	<i>Med</i>	<i>p-valor</i>
<i>Diagnóstico</i>	31	2,327	
<i>Pós-tratamento</i>	40	3,238	<0,001
1mes	39	2,915	0,006
3 meses	31	2,464	0,013
6 meses	23	2,643	0,527
1ano	22	1,568	0,072
2anos	13	1,252	0,001
<i>Anterior à reativação</i>	38	2,805	0,019
<i>Reativação</i>	31	4,017	<0,0001

* Grupo de comparação no teste Wilcoxon

As análises foram realizadas em amostras coletadas antes, durante e após: o tratamento inicial (*IRT1*), o segundo tratamento (*IRT2*) ou o terceiro tratamento (*IRT3*); (gráfico 6 e tabela 11).

A reatividade individual das amostras no ELISA de pacientes com reativações não foi homogênea quanto à intensidade de reativação nem quanto à elevação no momento da reativação (gráfico 6). Contudo, considerando-se em conjunto o *subgrupo IRT*, (*IRT1*, *IRT2* e *IRT3*), encontrou-se valor da mediana da UA na reativação (4,017) superior ao do momento do diagnóstico (2,327; Wilcoxon p-valor<0,0001) e ao do momento imediatamente pós-tratamento (3,238; p-valor=0,023) , tabela 10.

Gráfico 6. Resultados da reatividade, em unidades arbitradas (UA), do ELISA em amostras de pacientes com reativações coletadas antes, durante e após: (A) tratamento inicial (IRT1), (B) segundo tratamento (IRT2) terceiro tratamento (IRT3).



D= diagnóstico; R1= primeira reativação; R2= segunda reativação; Pt= final de tratamento; 1m= 1 mês; 3m= três meses; 6m= seis meses; 1a= um ano e 2a= dois anos após o tratamento, C= controles.

A soroprevalência de IgG, nos três subgrupos (momentos de acompanhamento), foi elevada em todos os pontos da análise, havendo poucas conversões para o estado de não reator durante o período de observação (Tabela 11). Encontrou-se correlação positiva entre os valores de UA das amostras no diagnóstico e no momento da reativação após tratamento ($r= 0,637$ p-valor $<0,01$).

Tabela 11. Soroprevalência de IgG detectada por ELISA e mediana das unidades arbitradas (UA) em amostras de pacientes com reativação coletadas antes e após: o tratamento inicial (I RT1), o segundo tratamento (I RT2) ou o terceiro tratamento (I RT3).

Período acompanhamento	I RT1		IRT2		IRT3	
	% reatores (N)	Med da UA	% reatores (N)	Med da UA	% reatores (N)	Med da UA
	Diagnóstico/R*	96,8 (31)	2,327	100 (27)	4,099	100 (10)
Pós-tratamento	95,2 (21)	3,321	100 (16)	3,17	100 (6)	3,138
1mes	100 (19)	2,9	94,4 (18)	2,76	85,7 (8)	3,142
3 meses	92,9 (14)	2,387	100 (18)	2,279	100 (6)	3,82
6 meses	88,9 (9)	2,652	100 (15)	2,678	100 (3)	2,207
1ano	100(3)	3,08	80 (15)	1,686	66,7(3)	1,193
2anos	-	-	71,4 (7)	1,252	50 (2)	0,866

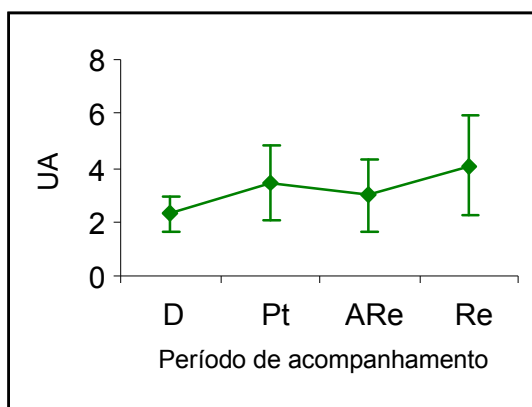
* Diagnóstico em IRT1 e reativação em IRT2 e IRT3

As medianas das unidades arbitradas do momento imediatamente anterior à reativação (med=2,850) e da reativação (med=4,016) também diferiram com significância estatística (Wilcoxon p-valor $<0,0001$). As médias das unidades arbitradas, cujos valores foram próximas às das medianas encontram-se no gráfico 7.

Analisando-se apenas as amostras antes da primeira reativação (*IRT1*) observou-se que a UA do momento do diagnóstico (2,327) foi inferior: à do pós-tratamento (med=3,321, Wilcoxon p-valor=0,002), a do momento anterior à reativação (med=2,804; p-valor=0,019) e a da reativação (med=4,01; p-valor,0,0001)

A frequência de amostras com UA superior a dois (24/27), também foi maior na reativação que nos demais momentos, todavia esta diferença não apresentou significância estatística.

Gráfico 7. Médias e desvios padrão das unidades arbitradas (UA) de soros de pacientes do subgrupo IRT (*IRT1*, *IRT2* e *IRT3*) avaliados por ELISA.



(D), no diagnóstico; (Pt), pós-tratamento (ARe), antes da reativação e (Re), na reativação.

Como regra, as aparentes perdas durante o período de seguimento foram consequência das reativações, que alteraram a classificação dos pacientes em momentos diferentes. As reativações ocorreram em sua maioria no primeiro ano após o tratamento, com 16 eventos até o terceiro mês, doze até seis meses e três com um ano ou mais. Ao final do período de estudo, treze pacientes haviam completado dois anos de acompanhamento da seguinte forma: sete completaram o acompanhamento após o segundo tratamento, dois após um terceiro tratamento e quatro após um quarto tratamento (dados não mostrados). Outros catorze pacientes

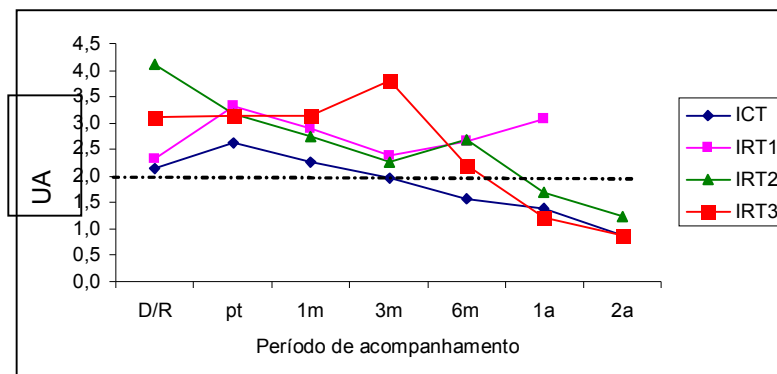
se encontravam em acompanhamento não tendo completado dois anos pós-tratamento até o final da coleta dos dados deste trabalho. Dois outros estão com tratamento em curso e apenas dois abandonaram o acompanhamento, um após seis meses e outro após um ano.

5.4.3 Comparação da resposta de IgG nos subgrupos de pacientes com cicatrização (ICT) e pacientes com reativação de lesões pós-tratamento (IRT).

A reatividade de todas as amostras de pacientes com reativação das lesões (IRT) foi mais elevada que a dos que se mantiveram com as lesões cicatrizadas (ICT) no período pós-tratamento como demonstrado pelas medianas das UA, respectivamente 1,840 e 2,739 (Mann-Whitney; p-valor<0,0001) (Tabela 8). No subgrupo ICT os valores de DO e a frequência de resultados positivos tenderam à redução ao longo do seguimento, enquanto que os do subgrupo IRT se mantiveram elevados ou tenderam a aumentar.

Avaliando-se o critério de linha de corte de UA>2, encontrou-se frequência de resultados positivos (UA>2) até o terceiro mês após o tratamento no subgrupo ICT, enquanto que no subgrupo IRT1 (pacientes antes da reativação) este valor foi observado até um ano após o tratamento. Todavia, as medianas destes subgrupos (ICT e IRT1), quando comparadas em cada ponto do acompanhamento apresentaram diferenças com significância estatística no sexto mês (Mann-Whitney; p-valor=0,046) e em um ano após o tratamento (p-valor=0,022). Como pode ser visto no gráfico 8, os valores médios de intensidade das reações no subgrupo ICT foram sempre inferiores aos obtidos com o subgrupo (IRT1, IRT2 e IRT3), apesar da ausência de significância estatística até o terceiro mês.

Gráfico 8. Medianas das unidades arbitradas (UA) do ELISA de amostras de soros de pacientes que se mantiveram com lesões cicatrizadas após tratamento (subgrupo ICT) e do subgrupo com reativação das lesões (IRT), após o primeiro (IRT1), segundo (IRT2) ou terceiro tratamentos (IRT3).



D/R= diagnóstico ou reativação; Pt= final de tratamento; 1m= 1 mês; 3m= três meses; 6m= seis meses; 1a= um ano e 2a= dois anos após o tratamento, C= controles.

No subgrupo IRT1 a frequência de UA superior a dois no momento da reativação foi de 88,9%, (24/27) como demonstrado na tabela 13 e gráfico 9. Por outro lado, no subgrupo ICT apesar da tendência de declínio da reatividade observada ao final de dois anos após o tratamento há ainda 48,2% de amostras reatoras, porém com UA superior a dois em 15,4% (22/26) delas (tabela 12).

Tabela 12. Percentuais de amostras com unidades arbitradas maiores que 2 (%UA>2) nos subgrupos (ICT) pacientes com lesão cicatrizada e (IRT1) pacientes antes da reativação. (N), número de amostras analisadas.

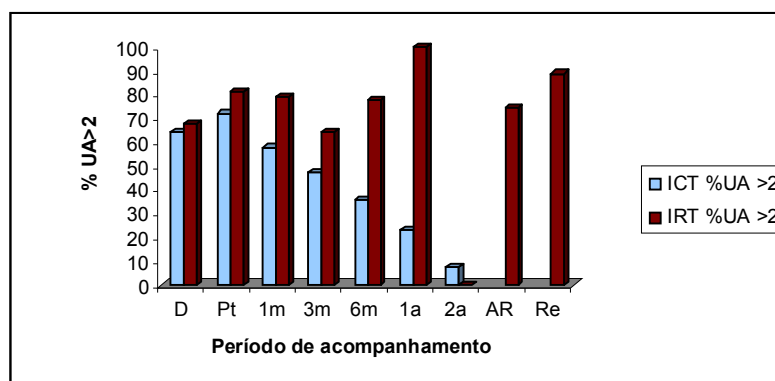
Subgrupos	% UA>2							ARe	Re
	D	Pt	1m	3m	6m	1a	2a		
ICT % UA >2	64	72	57,8	47	35,7	23	7,3	-	-
N	75	50	64	66	70	61	55	-	-
IRT1 % UA >2	67,7	81	78,9	64,3	77,8	100	-	74,1	88,9
N	31	21	19	14	9	3	-	31	27
p-valor*	0,889	0,619	0,161	0,378	0,039	0,023	-	-	-

* significância em teste Qui-quadrado (IC=95%)

D= diagnóstico Pt= final de tratamento; 1m= 1 mês; 3m= três meses; 6m= seis meses; 1a= um ano, 2a= dois anos após o tratamento, ARe= momento anterior à reativação e Re= reativação.

A diferença entre as proporções de amostras com UA maior que dois entre os subgrupos ICT e IRT, quando comparadas em cada momento do acompanhamento também diferem a partir do sexto mês.

Gráfico 9. Percentual de soros com unidade arbitrada maior que dois (% de UA > 2) nos subgrupos (ICT) com cura das lesões e (IRT1) antes da reativação.



D= diagnóstico Pt= final de tratamento; 1m= 1mês; 3m= três meses; 6m= seis meses; 1a= um ano, 2a= dois anos após o tratamento, AR= momento anterior à reativação e Re= reativação.

Da mesma forma, foi possível estabelecer uma associação entre recidiva e UA>2, estimada pela UA de chances (odds ratio; OR) a partir de três meses após o tratamento e pelo risco relativo (RR) a partir de um ano. A estes tempos, a chance dos pacientes que apresentaram UA>2 no ELISA recidivarem é nove vezes maior do que naqueles que apresentaram UA<2. (Tabela 13). O risco relativo (RR) assume significância a partir de 1 ano de acompanhamento, ou seja, com um ano de cura clínica, o risco de recidivas em pacientes com UA maior que dois é 3,9 vezes maior que naquelas com UA<2 (IC=95 %) (2,4 - 6,2) e aos 2 anos RR é de 12,2 vezes (IC 95% = 4,7 - 31,7).

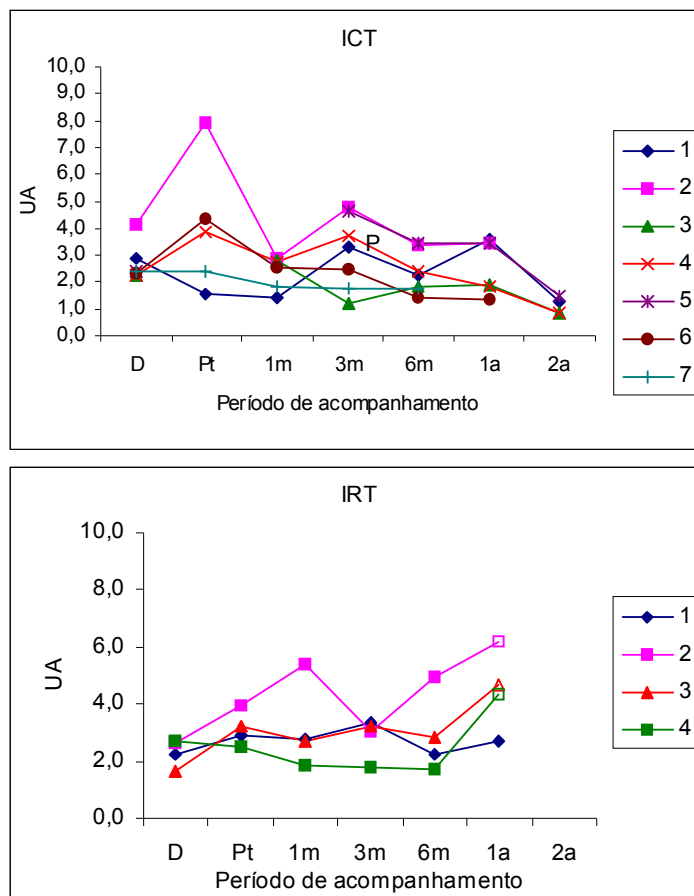
Tabela 13. Razão de chance (odds ratio; OR) de recidiva em pacientes com UA do ELISA maior que 2 (UA>2) comparado aos que não recidivaram (subgrupo ICT) no período acompanhado.

Períodos avaliados	OR	IC=95%
Diagnóstico	7,8	2,1 - 28-1
Pós-tratamento	3,1	08 - 11,9
1 mês	5,8	1,5 - 21-4
3 meses	9	2,5 - 32,9
6 meses	14	3,9 - 52,6
1 ano	26,8	7,1-102,6
2 anos	102	21,1 - 492,1

5.4.4 Controle pós-tratamento de pacientes com LCM.

Entre os pacientes com a forma cutâneomucosa, onze preencheram os critérios estabelecidos para o estudo de acompanhamento (Gráfico 10). Todas as amostras foram reatoras ao ELISA no diagnóstico. Não houve diferença entre as medianas da UA dos *subgrupos* ICT e ITR no diagnóstico, cujos valores foram 2,0393 e 2,430 respectivamente. Em sete, as lesões se mantiveram cicatrizadas (ICT) durante o período de acompanhamento pós-tratamento que variou entre seis meses, um ano e dois anos. Nas amostras de quatro destes pacientes acompanhados até dois anos, se observou conversão para negatização do ELISA em dois. Nos outros dois a positividade no ELISA se manteve com valores de UA de 1,2 e 1,5 respectivamente. Em um paciente acompanhado até o sexto mês e dois outros acompanhados até um ano após o tratamento, se observou a manutenção da reatividade do ELISA com UA, respectivamente, de 1,7; 1,4 e 3,4.

Gráfico 10. Reatividade no ELISA, em unidade arbitrada (UA), de soros de sete pacientes com leishmaniose cutâneo-mucosa distribuídos nos subgrupos ICT (cicatrização das lesões) e de quatro do grupo IRT (com reativação de lesões).



(D), no diagnóstico; (Pt), logo após o tratamento (1m) um mês, (3m) três meses, (6m) seis meses, um ano (1a) e dois anos (2a) pós- tratamento.

Em quatro outros casos houve reativação de lesões (IRT). Em três deles a reativação ocorreu um ano após o tratamento e em um deles após dois anos. Todos apresentaram o perfil geral semelhante ao descrito para o subgrupo IRT, ou seja, mediana da UA (4,491) no momento da reativação mais elevada que a observada imediatamente anterior à reativação e ao momento logo após o pós-tratamento (3,064). Entretanto as diferenças entre as medianas nos momentos de acompanhamento não são significativas.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliou-se o ELISA para diagnóstico e investigação de resposta terapêutica imediata e pós-tratamento em amostras de soro de pacientes com suspeita de LTA atendidos no Vigileish – IPEC - FIOCRUZ, Rio de Janeiro – Brasil.

O emprego do ELISA para determinação de anticorpos séricos específicos na LTA baseia-se na sua elevada sensibilidade relacionada ao limiar de detecção deste método (Voller, 1978; Porstmann & Kiessig, 1992; Singh, 2006). Contudo, a precisão pode variar em função da forma evolutiva, da espécie de *Leishmania* e das preparações utilizadas como antígeno nestes ensaios. Neste estudo, os resultados do ELISA revelaram excelente reprodutibilidade e valores elevados de acurácia (de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e UA de verossimilhança), confirmando estudos anteriores de nosso grupo para determinar a espécie de *Leishmania* (Barroso-Freitas et al., 2009) e o sistema revelador (Nascimento et al., 2009) a serem utilizados no teste. Alguns autores também relatam melhor sensibilidade do ELISA ou RIFI com antígenos de espécie homóloga à responsável pela infecção (Furtado, 1980; Yoneyama et al., 2007). Outros encontraram sensibilidade no ELISA, entre 62% e 85%, com baixos valores preditivos (Guimarães & Celeste, 1991; Brito et al., 2000; Ferreira et al., 2006). Estas divergências podem ser devidas ao emprego de diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis* na preparação dos antígenos, a diferenças nos protocolos utilizados nos ensaios e ainda à diversidade genética do parasito infectante encontrada nas diversas áreas endêmicas. (Saravia et al., 1989) observaram maior intensidade de resposta humoral significativa em pacientes com infecção por *L. (V.) braziliensis* que por

Leishmania (V.) panamensis em casos de LC. Romero et al., 2005 encontraram maior reatividade de soros a antígenos de *L. (L.) amazonensis* em amostras de pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* que nos infectados por *L.(V.) guyanensis*.

Embora não seja do nosso conhecimento a existência de estudos relacionando diversidade genética de isolados de uma mesma espécie com resposta humoral, o encontro de diferentes genótipos e fenótipos para isoenzimas e para moléculas de superfície reconhecidas por anticorpos monoclonais é relatado por diversos autores (Romero et al., 2002; Nolder et al., 2007). Baptista et al., 2009 demonstraram a existência de nove genótipos diferentes de *L. (V.) braziliensis* isolados de pacientes do Rio de Janeiro. Híbridos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) peruviana*, e *Leishmania (V) naiff* e *Leishmania (V) lainsoni* foram demonstrados por Tojal da Silva et al., 2006 e Nolder et al., 2007. Tal variabilidade genética em espécies causadoras de LTA poderia se refletir na imunogenicidade dos parasitos produzindo diferenças na resposta humoral do hospedeiro. Por outro lado, poderia ser de importância a modalidade da infecção, recidivante ou de mucosa e, nesse caso, se primária ou secundária metastática, associada ou não a diferentes genótipos.

Inúmeros epítomos e moléculas em preparações antigênicas não purificadas (Williams et al., 1986) empregadas em testes sorológicos, como a utilizada neste estudo, podem contribuir para a existência de possíveis reações cruzadas, podendo também interferir negativamente na reprodutibilidade destes ensaios. Entretanto, apesar da existência de pesquisas visando o encontro de moléculas com boa antigenicidade e imunogenicidade para fins diagnósticos e também de vacinação, os resultados não têm se mostrado superiores aos obtidos com extratos parasitários e

frações antigênicas não purificadas (Vidigal Cde et al., 2008). Algumas dessas moléculas são amplamente conhecidas e estudadas tais como a principal proteína glicoproteína de superfície de membrana gp63 (Bouvier et al., 1985), proteínas da família de choque térmico, (“heat shock”) Hsp70, Hsp83 (Celeste et al., 2004), proteína de membrana de cinetoplasto, KMP-11, entre outras. Apesar destas considerações, os resultados do ELISA para a avaliação de IgG específica em pacientes com LTA com antígeno não purificado de *L. (V.) braziliensis*, aqui apresentados demonstraram bons parâmetros de acurácia.

A especificidade foi estimada com a análise de amostras do grupo controle, representativo da população do estudo, constituído por indivíduos com suspeita inicial de LTA, posteriormente afastada pela confirmação de outro diagnóstico. Desta forma, não foram incluídas amostras de pacientes com LV, doença de Chagas e outras doenças que não se constituem em diagnóstico diferencial de LTA e pela baixa probabilidade da ocorrência dessas co-morbidades na população do estudo. Nestes casos, a frequência de reações cruzadas com antígenos de *Leishmania* não definidos poderia ser elevada (Furtado, 1980; Williams et al., 1986; Vexenat et al., 1996). Inversamente, a esporotricose é endêmica no estado e representa a principal causa de investigação para o diagnóstico diferencial com LTA no RJ (de Lima Barros et al., 2003) . Há sobreposição de áreas endêmicas, além de semelhanças em suas características clínicas e epidemiológicas. Em estudos anteriores foi encontrado um percentual expressivo de reações cruzadas no ELISA (22%) com antígeno de *Leishmania major*-“like” e na IDR (39%), (de Lima Barros et al., 2005). Neste estudo, com antígeno de *L. (V.) braziliensis*, apenas um entre 44 soros de pacientes com esporotricose apresentou reatividade ao ELISA, as quatro demais reações positivas, ocorreram em amostras de pacientes com infecções bacterianas e

carcinoma, totalizando 4,8% de reações inespecíficas. Uma das possíveis explicações para este reduzido número de falsos positivos encontrados poderia ser a maior afinidade dos anticorpos dos pacientes com LTA para antígenos homólogos, resultando em reações específicas mais intensas, favorecendo melhor ponto de corte (“cut-off”) no ELISA e, conseqüentemente melhoria nos parâmetros de acurácia. Por outro lado, pode-se também considerar a possibilidade de parte destas reações serem específicas por se tratar de indivíduos de área endêmica.

A elevada concentração sérica de IgG específica está associada à gravidade nas leishmanioses, bem exemplificado na LCD e na LV nas quais se pode observar níveis muito altos de anticorpos (Marzochi & Marzochi, 1994; Silveira et al., 2004). Na forma mucosa, a maioria dos autores se refere a níveis séricos moderadamente elevados (Saravia et al., 1989; Silveira et al., 2004). Corroborando estes relatos, encontrou-se aqui reatividade em todas as amostras de pacientes com LCM analisadas e diferenças com significância entre as medianas das UA do ELISA das amostras de pacientes com LC (UA=2,0) e com LCM (UA=2,4). Também se observou correlação positiva fraca entre os valores de UA e as formas clínicas, admitindo-se valor numérico de um e dois para LC e LCM respectivamente. Quanto à relação tempo de evolução das lesões e intensidade de reação, não foram observadas correlações significativas, diferentemente dos resultados obtidos por Labrada et al., 1989, .cujos resultados foram superiores em pacientes com mais de um mês de evolução das lesões. Porém, houve correlação fraca e positiva entre intensidade de reação e número de lesões ($r = 0,268, p < 0,01$) e diâmetro das lesões ($r = 0,207, p < 0,05$). Estes achados foram observados por outros autores (Chiari et al., 1973b; Saravia et al., 1989) que atribuem este fato à presença de maior número de parasitos em lesões múltiplas, tendo como conseqüência maior estímulo antigênico.

A sensibilidade do ELISA foi superior à encontrada em todos os demais exames realizados, não se observando diferença significativa entre esta e a da IDRM e da PCR. Por outro lado, a sensibilidade dos testes parasitológicos foi baixa, especialmente a do exame direto cujo valor foi inferior a 50%. A sensibilidade do exame direto em esfregaços corados Giemsa, Wright, Leishman ou Fulgem é conflitante na literatura encontrando-se percentuais entre 13,3% e 100% de positividade (Furtado, 1980; Mendonca et al., 1986; Romero et al., 2001; Amato et al., 2003). Entretanto, parece haver um consenso quanto aos exames parasitológicos, no qual a positividade obtida é inversamente proporcional ao tempo de infecção (Furtado, 1980; Guimarães et al., 1989; Hepburn, 2003). O exame direto é utilizado nos laboratórios da rede pública para o diagnóstico de LTA, não sendo do nosso conhecimento o percentual de positividade obtido nessas análises. É possível que poucos sejam os casos de LTA efetivamente confirmados nestes laboratórios por este método. Pode-se argumentar que melhores resultados de acurácia podem ser obtidos em pacientes com infecções por outras espécies de *Leishmania*, especialmente *L. (L.) amazonensis*, que apresenta maior probabilidade do encontro de formas amastigotas no exame direto. Porém, a espécie dermatotrópica mais difundida nas diversas regiões do Brasil é *L. (V.) braziliensis*, inclusive no estado do Rio de Janeiro, e se caracteriza por fraco crescimento em meios de cultura e escassez de parasitos nas lesões. Em estudo comparativo entre aspectos clínicos e laboratoriais de infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* de duas diferentes regiões do Brasil, Romero et al. (2001) detectaram percentuais de positividade em preparações de exame direto de 24% na primeira situação e 92,6% para a segunda. Estes dados, entre outros da literatura, parecem confirmar a visão que o diagnóstico da LTA nas diversas regiões do Brasil causados por diferentes

espécies de *Leishmania* não deveria ser tratado como um procedimento padrão único (Furtado, 1980; Amato et al., 2003).

O bom desempenho do ELISA quando comparado ao da histopatologia, não surpreende, em função das dificuldades já descritas anteriormente com relação ao encontro de parasitos em espécimes de lesões causadas por *L. (V.) braziliensis*. Os índices de sensibilidade do exame histopatológico encontrados na literatura têm uma amplitude de variação muito grande (Furtado, 1980; Amato et al., 2003) aqui se encontrou 63,9%. Por outro lado, no exame histopatológico há visualização local de células e de formações características e sugestivas do processo inflamatório induzido pelo parasito, com ou sem visualização de amastigotas. Contudo, tais alterações, algumas vezes também não são identificadas (Furtado, 1980; Amato et al., 2003).

A diferença observada entre as sensibilidades do ELISA (94,7%) e do isolamento em meio de cultura axênica (76%) também foi significativa. Este método está geralmente disponível em instituições de pesquisa e em centros de referência devido ao custo elevado e à infra-estrutura necessária à sua realização. Além disto, tem como desvantagem a possibilidade de contaminação por outros microorganismos levando a resultados falsos negativos e o tempo necessário para o crescimento de *Leishmania* é variável, que pode se alongar até um mês.

Frente à PCR os resultados de ELISA confirmam a boa performance já discutida nos parágrafos anteriores. Introduzida na última década como ensaio diagnóstico, além dos bons índices de acurácia a PCR possibilita a identificação da espécie de *Leishmania* pelo emprego de oligonucleotídeos espécie-específicos. Na rotina diagnóstica do Vigileish esta técnica foi recentemente introduzida para avaliação de pacientes de LTA do Rio de Janeiro apresentando sensibilidade de

94% (Fagundes, 2007a). A relativa complexidade operacional e custos elevados limitam seu emprego, não sendo possível o uso na maioria dos laboratórios de rotina diagnóstica.

A boa correlação de resposta humoral, avaliada por ELISA, com infecção e diagnóstico clínico também foi observada durante este estudo em sete pacientes que apresentavam fortes evidências clínico/epidemiológicas de LTA. Os resultados de exames parasitológicos foram negativos (histopatologia, exame direto e cultura), mas com reatividade no ELISA em amostras de seis dos sete pacientes. Estes foram submetidos à terapia específica evoluindo com resolução das lesões. A PCR, realizada posteriormente com espécime clínico da época do diagnóstico, identificou positividade em todas as amostras. A discordância do ELISA se deu em um dos casos apenas.

O bom desempenho do ELISA frente aos testes parasitológicos e à PCR, demonstram que quando alguns destes testes falharam em diagnosticar corretamente, o ELISA pode produzir um resultado verdadeiro. Ainda que testes sorológicos não se constituam em ferramenta conclusiva para o diagnóstico de leishmanioses o seu valor junto às evidências clínico/epidemiológicas, a nosso ver, não deve ser subestimado.

Não se encontrou correlação entre a intensidade de reação do ELISA e da IDRM. Esta ausência de correlação é conhecida e relatada por diversos autores (Mendonca et al., 1986; Silveira et al., 2004). Porém, a concordância de resultados positivos entre os casos de LTA foi elevada encontrando-se sensibilidades, respectivamente, de 94,7% e 92,3%. Na prática clínica, a IDRM é muito empregada como auxiliar ao diagnóstico da LTA, especialmente em condições de difícil acesso a exames parasitológicos ou na ausência de resultados positivos destes. A

credibilidade da IDRMM como teste diagnóstico se deve à boa correlação com a presença de lesões e por representar uma resposta imune do hospedeiro produzida por linfócitos T cujas funções estão fortemente associadas à resposta protetora. Apesar da sua elevada sensibilidade existem limitações relativas à baixa reatividade no início da infecção, à permanência de resultados positivos muitos anos após a cura clínica ou por toda a vida, à possibilidade de reações cruzadas e a reações falso positivas ao preservante usado na preparação do antígeno (Marzochi et al., 1998; de Lima Barros et al., 2005; Fagundes et al., 2007a). Nossos resultados são consistentes com estas observações; não houve reatividade na IDRMM em 10 pacientes do *grupo I* com tempo de evolução das lesões variando entre um e três meses, nestes o ELISA foi reator. Por outro lado, entre os reatores à IDRMM do *grupo II* (37/100), apenas três foram reatores ao ELISA. Todavia, não se pode descartar a possibilidade destas reações serem específicas, já que os indivíduos residiam em áreas endêmicas. A concordância *kappa* observada entre os testes foi baixa 0,542 devido à elevada reatividade observada na IDRMM neste segundo grupo (não doentes). Desta forma, a performance do ELISA, nas condições deste estudo, foi superior à da IDRMM, considerando-se a especificidade de ambas. Por estas unidades arbitradas, a análise da associação do ELISA com a IDRMM, combinadas em paralelo, quando se considera os resultados positivos dos dois testes, produziu sensibilidade próxima a 100% mas com especificidade baixa (61%). A associação em série produz sensibilidade e especificidade elevadas, respectivamente 88% e 98%, com valor preditivo positivo de 98,4% (IC=95; 93,3 - 99,7) o emprego destes testes em associação também pode ser uma alternativa para o diagnóstico na ausência de resultados parasitológicos positivos.

O controle da cura clínica de pacientes com LTA é importante para detecção precoce de recidivas cuja ocorrência não é rara Chiari et al. (1973a). Em casos de LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, além das recidivas no mesmo sítio anatômico, há possibilidade de surgimento de lesões em mucosas após a cura clínica de pacientes com diagnóstico inicial de LC. O diagnóstico e tratamento precoce de lesões em mucosas se justificam pela possibilidade de evolução com elevado poder destrutivo, geralmente com comprometimento cartilaginoso, das vias aéreas superiores.

O declínio da resposta humoral após a terapia específica, avaliado pela redução da intensidade das reações de IgG no ELISA, em pacientes que não apresentaram reativação de lesões (*grupo ICT*), é consistente com relatos existentes na literatura tanto para LC quanto para LCM (Souza et al., 1982; Labrada et al., 1989; Convit et al., 1993). A intensidade das reações aferida ao final do tratamento foi superior à do momento do diagnóstico, iniciando uma curva decrescente um mês após o tratamento. É possível que este aumento de reatividade imediatamente após a terapia seja consequência de uma maior liberação de antígenos devido à destruição de células infectadas e de amastigotas gerando maior ativação da resposta humoral. Aumento de títulos de anticorpos em RIFI precedendo a cicatrização da lesão em pacientes de LTA também foi observado em percentuais variados por alguns investigadores (Chiari et al., 1973a; Souza et al., 1982; Convit et al., 1993). Coincidindo com estes achados, em investigação de resposta linfoproliferativa de pacientes com LC, Mendonça et al., 1986 observaram resposta significativamente mais elevada a antígenos de *Leishmania* durante a terapia que antes da terapia. Os autores também relacionam este fato à destruição de parasitos e consequente aumento da resposta imune celular. Apesar da ausência de

correlação entre resposta celular e resposta humoral e do pouco conhecimento desta na imunopatologia da doença, o fato é que estímulo antigênico também induz produção de anticorpos.

No presente estudo, a intensidade das reações só se tornou significativamente inferior à do momento do diagnóstico a partir do sexto mês após a terapia, mas o percentual de indivíduos reatores nesta época ainda foi da ordem de 88%. Somente após dois anos a frequência de reatores, ainda que de baixa intensidade, ficou inferior a 50%. Entretanto, UA maior que dois foram encontradas apenas, em 7,3% das amostras analisadas neste período. Neste aspecto, estes resultados diferem de alguns encontrados na literatura os quais relatam negatificação de testes sorológicos na maioria dos pacientes, a partir de três a quatro meses após a terapia bem sucedida. Estas divergências possivelmente se devem ao teste empregado nestas pesquisas, a RIFI. De fato, em nossa experiência em diagnóstico de pacientes no Rio de Janeiro, observamos que na maioria das vezes detecta-se primeiro a redução e/ou negatificação dos títulos de imunofluorescência indireta e posteriormente redução ou negatificação do ELISA (dados não mostrados). Além do limiar de detecção inerente às metodologias os antígenos usados são de natureza diferente. Na RIFI, são empregados parasitos íntegros, conseqüentemente há exposição de antígenos de superfície para reconhecimento pelos anticorpos das amostras testes. No ELISA, em geral e também no nosso caso, se utilizam extratos solúveis oriundo de rompimento dos parasitos por ultrassom contendo antígenos citoplasmáticos (Williams et al., 1986).

As amostras do subgrupo com reativação de lesões (*subgrupo IRT*) apresentaram elevados valores de DO cuja mediana da UA (2,739) diferiram significativamente daquelas do *subgrupo ICT* (1,840). Aumento da intensidade de

reação após o tratamento também foi detectado neste *subgrupo* diferindo do anterior pelo fato que, após uma redução dos valores de UA, a intensidade das reações volta a aumentar por ocasião da reativação, iniciando um novo declínio após o re-tratamento. Portanto, este grupo de pacientes apresentou um perfil de reatividade característico no ELISA: positividade no diagnóstico, elevação da reatividade logo após a terapia específica seguida por leve redução, e nova elevação acima dos níveis alcançados no momento da recidiva.

A análise do *subgrupo IRT1*, (antes da primeira reativação) também demonstra que o percentual de soros com reatividade superior a duas vezes o “cut-off” ($UA > 2$) tende a permanecer elevado até um ano quando quase todos os pacientes já reativaram. Apesar do pequeno número de amostras analisadas aos 6 meses após o primeiro tratamento, a proporção de soros com $UA > 2$ é significativamente maior neste subgrupo (77,8) que no ICT (35,7). Portanto, apesar das diferenças individuais o comportamento dos *subgrupos ICT* e *IRT* difere na intensidade da reação e na tendência observada ao longo do acompanhamento a partir de seis meses. Por outro lado, a chance de recidivas significativamente mais elevada em pacientes com $UA > 2$ que aqueles com $UA < 2$ aumenta à medida que ocorrem em períodos mais distante do final do tratamento. Estes resultados são compatíveis com as observações, já discutidas anteriormente, de redução de parasitos após a cura clínica e eventual retorno de multiplicação por ocasião de recidivas.

Devido a diversidade de resposta humoral nos pacientes com LTA , que inclui pobre resposta de anticorpos específicos em muitos pacientes, o “cut-off” , como calculado neste estudo, atende às necessidades do diagnóstico. No entanto, para monitoramento pós-tratamento, este critério poderia ser substituído adotando-se

UA>2 a partir do terceiro ou sexto mês como cut-off para ser usado no controle pós-tratamento dos pacientes de LTA do Rio de Janeiro.

Nos pacientes com LCM o perfil observado durante o acompanhamento foi semelhante ao do conjunto de resultados discutidos anteriormente. Apesar do pequeno número de amostras de pacientes com LCM, se observou frequência de reativação semelhante ao descrito (4/10) para o conjunto dos casos. As intensidades de reações no momento diagnóstico foram semelhantes para os que curaram e os que recidivaram. Com um ano de acompanhamento, os pacientes com LCM do *subgrupo ICT* apresentaram mediana de UA de 2,633 enquanto que a mediana do *subgrupo IRT* foi 4,491 na reativação (entre seis meses e um ano), apesar da ausência de significância estatística.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por vários investigadores, alguns desde a década de 60, que identificaram um percentual de pacientes nos quais detectaram anticorpos circulantes após a terapia e cicatrização das lesões (Bittencourt et al., 1968; Souza et al., 1982; Mendonca et al., 1986). O risco de recidiva nestas circunstâncias foi apontado por todos os autores como elevado devido à possível persistência do parasito mesmo após a cura clínica. Reforçando estas hipóteses, em pesquisas mais recentes, (Schubach et al., 1998 & 2001) encontraram amastigotas viáveis em cicatrizes de pacientes 11 anos após terapia e cura, além de DNA e antígenos parasitários. Porém, não se encontrou reatividade na RIFI nestes pacientes. Amato et al., (2003) também identificaram, por imunohistoquímica antígenos de *Leishmania* em 40% de pacientes seis meses após tratamento em estudo para caracterização de resposta inflamatória local de pacientes com LCM antes e após tratamento. Apesar de observarem variações no

número de células relacionadas à patogenia das lesões, a frequência de células B permaneceu inalterada após seis meses de tratamento e aparente cura das lesões.

Em conjunto, os resultados demonstram uma tendência à redução dos níveis de IgG séricas específicas em pacientes com cura clínica mantida. Contrariamente, a manutenção ou elevação de anticorpos específicos podem estar associadas a reativação.

Sugere-se que, no Rio de Janeiro, o ELISA seja utilizado tanto para o diagnóstico de LTA, quanto para o controle pós-tratamento de suas modalidades cutânea e mucosa.

7 CONCLUSÕES

Os resultados de avaliação do ELISA e do acompanhamento sorológico para detecção de IgG nas condições do estudo permitem concluir:

- Os parâmetros de acurácia, e a confiabilidade do ELISA para detecção de IgG específica demonstram um bom desempenho do teste para o diagnóstico da LTA.
- A baixa reatividade cruzada com soros de indivíduos com esporotricose ou com outras doenças dermatológicas confirmam a possibilidade do uso do ELISA para o diagnóstico diferencial da LTA no Rio de Janeiro.
- A sensibilidade do ELISA não diferiu da encontrada para a IDRM e a PCR e foi superior à de cada uma das técnicas parasitológicas, exame direto, histopatologia e isolamento em meio de cultura.
- A associação do ELISA com IDRM em série resultou em ganhos na especificidade do diagnóstico imunológico com pouca perda na sensibilidade.
- A frequência de resultados positivos e os níveis de IgG encontrados em amostras de pacientes com LTA que não apresentaram reativação de lesões, tendeu a decrescer ao longo do tempo de acompanhamento.
- Os níveis séricos de IgG anti-*Leishmania* foram significativamente mais elevados no momento de reativação (*subgrupo IRT*).
- Com base nos itens anteriores, pode-se concluir que o ELISA se constitui em ferramenta apropriada para monitorar a cura clínica ou recidiva pós-

tratamento de pacientes com LTA ressaltando-se as chances mais elevadas de recidivas em pacientes cujos resultados apresentem UA maior que dois quando se utiliza este protocolo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, R.E. 1977. Immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and immunofluorescence in diagnosis of Sudan mucosal leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** **26**: 1135-8.

Al-Qadhi, K. and Haroun, A.A. 1976. Preliminary study on haemagglutination on kala-azar as a diagnostic test. **J Faculty Med Bagdha** **18** (1 e 2): 76.

Allan, D.S. and Kagan, I.G, 1975. A direct agglutination test for leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** **24**: 232-6.

Altamirano-Enciso, A.J., Marzochi, M.C. Moreira, J.S., A.O. Schubach, and K.B. Marzochi. 2003. [On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source]. **Hist Cienc Saude Manguinhos** **10**: 852-82.

Amato, V.S., de Andrade, H.F. and. Duarte, M.I. 2003. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Trop** **85**: 39-49.

Anderson, C.F., Gerber, J.S and Mosser D.M. 2002. Modulating macrophage function with IgG immune complexes. **J Endotoxin Res** **8**: 477-81.

Anthony, R.L., Christensen, H.A and. Johnson, C.M. 1980. Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** **29**: 190-4.

Antunes, L.J., des Reis, A.P Pereira C.A., Tavares, and J. Pellegrino, J. 1972. [Determination of immunoglobulins and passive hemagglutination reaction in patients with mucocutaneous leishmaniasis]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **14**: 203-6.

Aragão, H.B. 1922. Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. **Brazil Médico** **36**: 129.

Aston, D.L., and Thorley A.P. 1970. Leishmaniasis in Central Brazil: results of a Montenegro skin test survey among Amerindians in the Xingu National Park. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **64**: 671-8.

Auricchio, L. 1927. Ricerche sierodiagnostiche nella leishmaniosi infantile. **La Pediatria**, **35**: 747.

Azeredo-Coutinho, R.B., Conceicao-Silva, F., Schubach, A. Cupolillo, E. Quintella, LP, Madeira, M.F., Pacheco, R.S. Valet-Rosalino, C.M. and Mendonca S.C. 2007. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **101**: 735-7.

Badaro, R., Reed, S.G. and Carvalho, E.C. 1983. Immunofluorescent antibody test in American visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. **Am J Trop Med Hyg** **32**: 480-4.

Badaró, R., Eulalio, M.C., Benson, D., Freire M., Miranda, J.C., Pedral-Sampaio, D., Burns, J.M., David, Jr. J.R., Johnson, W.D. and Reed. S.G. 1993. Sensitivity and specificity of a recombinant *Leishmania chagasi* antigen in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Arch Inst Pasteur Tunis** **70**: 331-2.

Badaró, R., Reed, S.G. Barral, A. Orge, G and. Jones, T.C. 1986. Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. **Am J Trop Med Hyg** **35**: 72-8.

Baptista, C., Schubach, A.O., Madeira, M.F., Leal, C.A., Pires, M.Q., Oliveira, F.S., Conceicao-Silva, F.S., Rosalino, C.M., Salgueiro, M.M., and Pacheco R.S. 2009. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Exp Parasitol** **121**: 317-22.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho E. M., et al. 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1991 May;44(5): 536-46.

Barral-Netto, M., Brodskyn, C., Carvalho, E.M., Barral, A. 1998. Human_leishmaniasis/cytokines.bahia.br. **Braz J Med Biol Res** **31**: 149-55.

Barroso-Freitas, A.P., Passos, S.R., Mouta-Confort, E., Madeira, M.F., Schubach, A.O. Santos, G.P., Nascimento, L. D., Marzochi, M.C. and Marzochi, K. B. 2009. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. **103**(4): 383-9.

Belkaid, Y., Blank, R.B. and Suffia I. 2006. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. **Immunol Rev** **212**: 287-300.

Belkaid, Y., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D.L. and. Ribeiro, J.M. 2000a. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? **Proc Natl Acad Sci U S A** **97**: 6704-9.

Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G. and Sacks D. 2000b. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J Immunol** **165**: 969-77.

Bittar, R.C., Nogueira, R.S., Vieira-Goncalves, R., Pinho-Ribeiro, V., Mattos, M.S. Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G. and Da-Cruz A.M. 2007. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **102**: 625-30.

Bittencourt, A.L., Sodré, A., and. Andrade, Z.A. 1968. [Detection of circulating antibodies by the immunofluorescence method in cutaneous leishmaniasis]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **10**: 247-252.

Bossuyt, P.M., Reitsma, J.B. Bruns, D.E., Gatsonis, C.A., Glasziou, P.P., Irwig L.M., Moher, D., Rennie, D., de Vet, H.C. and Lijmer, J.G. 2003. The STARD statement for

reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. **Clin Chem** **49**: 7-18.

Bouvier, J., R.J. Etges, R.J. and Bordier, C. 1985. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania promastigotes*. **J Biol Chem** **260**: 15504-9.

Bray, R.S., and Lainson, R. 1965. The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **59**: 535-44.

Bray, R.S., and R. Lainson. 1967. Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. V. The use of particles as vehicles in passive agglutination tests. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **61**: 490-505.

Brener, Z.P.J. 1957. Reação de precipitina cruzada, no calazar, com fração polissacarídica isolada de formas de cultura de *Schizotrypanum cruzi* e *Leishmania braziliensis*. **Rev Bras Malariol D Trop** **18** (2): 501.

Brito, M.E., Mendonca, M.G., Gomes, Y.M., Jardim, M.L. and Abath, F.G.. 2000. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clin Diagn Lab Immunol** **7**: 318-21.

Brown, D.R., and Reiner, S.L. 1999. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. **Infect Immun** **67**: 266-70.

Caldas, A., Favali, C. Aquino, D., Vinhas, V., van Weyenbergh, J. Brodskyn, C., Costa, J. Barral-Netto, M. and Barral, A. 2005. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis** **5**: 113.

Campanelli, A.P., Roselino, A.M., Cavassani, K.A., Pereira, M.S., Mortara, R.A., Brodskyn, C.I., Goncalves, H.S., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A. and Silva, J.S.. 2006. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J Infect Dis** **193**: 1313-22.

Castés M, Tapia, F.J. 1998. Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis. **Acta Cient Venez.**; **9**(1): 42-56.

Celeste, B.J., S.O. Angel, S.O., L.G. Castro, M. Gidlund, and H. Goto. 2004. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res** **37**: 1591-3.

Chang, S.L., and Negherborn, W.O. 1947. Studies on hemoflagellates: III - The specificity of serological reaction of *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania tropica* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Inf. Dis.** **87**: 209.

Chaves CS. 1981 Reações de aglutinação direta para o diagnóstico das leishmanioses. **Tese para obtenção de grau de mestre apresentada ao Instituto de Microbiologia da UFRJ.**

Chen, L., Z.H. Zhang, T. Watanabe, T. Yamashita, T. Kobayakawa, A. Kaneko, H. Fujiwara, and F. Sendo. 2005. The involvement of neutrophils in the resistance to *Leishmania major* infection in susceptible but not in resistant mice. **Parasitol Int** **54**: 109-118.

Chiari, C.A., W. Mayrink, and P.A. Magalhães. 1973a. [Indirect immunofluorescent reaction in the control and treatment of American cutaneous leishmaniasis]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** **15**: 298-303.

Chiari Cde A, Magalhaes P, Mayrink W. 1973b. [Determination of antibodies by immunofluorescence in sera of patients with recent cutaneous lesions of mucocutaneous American leishmaniasis]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **15**(5): 304-9.

Colmenares, M., Constant, S.L., Kima, P.E. and McMahon-Pratt, D. 2002. *Leishmania pifanoi* pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. **Infect Immun** **70**: 6597-605.

Conceição-Silva, F., Dórea R, Pirmez C, Schubach A.O., Cysne L, Coutinho SG. 1988. Frequency of *Leishmania*-reactive T cells in lesions of American mucocutaneous leishmaniasis (AMCL) patients. Its relevance in the process of healing or aggravation of the disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **83**(Suppl 1): 403-6.

Convit, J., and Pinard, M.E. 1969. Applying the indirect immunofluorescence test to the study of American cutaneous leishmaniasis. **Dermatol Int** **8**: 17-20.

Convit, J., Ulrich, M., Fernandez, C.T., Tapia, F.J., Caceres-Dittmar, G., Castes, M. and Rondon, A.J. 1993. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **87**: 444-8.

Costa, D.J., Favali, C., Clarencio, J. Afonso, L., Conceicao, V., Miranda, J.C, Titus, R.G.,Valenzuela, J., Barral-Netto, M., Barral, A. and Brodskyn, C.I.. 2004. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect Immun** **72**: 1298-305.

Coutinho, S.G., Da-Cruz, A.M. Bertho, A.L., Santiago, M.A. and De-Luca, P. 1998. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res** **31**: 139-42.

Cuba Cuba, C.A., Marsden, P.D. Barreto, A.C. Rocha, R. Sampaio, R.R and Patzlaff, L. 1980. [Parasitologic and immunologic diagnosis of American cutaneous leishmaniasis]. **Bol Oficina Sanit Panam** **89**: 195-208.

Cuba Cuba, C.A., Marsden, P.D. Barreto, A.C., Jones, T.C. and F. Richards, F. 1985. The use of different concentrations of leishmanial antigen in skin testing to evaluate delayed hypersensitivity in American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop** **18**: 231-236.

Cunha, A.M. 1938. A aglutinação e o diagnóstico diferencial das leishmanioses. **Brasil-Med.** **38**.

Cunningham, D.D. 1885. On the presence of peculiar parasitic organisms in the culture of a specimen of Delhi Boil. **Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army in India 1**: 21-31.

de Lima Barros MB, de Oliveira Schubach A, Galhardo MC, Schubach TM, dos Reis RS, Conceição MJ, do Valle AC. 2003. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. **Int J Dermatol 2003; 42(9)**: 677-81.

de Lima Barros, M.B., Schubach, A., Francesconi-do-Valle, A.C., Gutierrez-Galhardo, M.C., Schubach, T.M., Conceicao-Silva, F., Salgueiro, M.M., Mouta-Confort, Reis, M.M., Madeira, M.F., Cuzzi, T.C., Quintella, L.P., Passos, J.P., Conceicao, M.J. and Marzochi, M.C.A.. 2005. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio De Janeiro. **Acta Trop 93**: 41-7.

Elassad, A.M., Younis, S.A., Siddig, M., Grayson, J., Petersen, E. and Ghalib. H.W. 1994. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. **Clin Exp Immunol 95**: 294-9.

Faber, W.R., Oskam, L., van Gool, T. Kroon, N.C., Knecht-Junk, K.J., Hofwegen, H. van der Wal, A.C. and Kager, P.A. 2003. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol 49**: 70-74.

Fagundes, A., Marzochi, M.C. Perez, M. Schubach, A., Ferreira, A., Silva, J.P., Schubach, T. and Marzochi, K.B. 2007a. Skin reactivity to thimerosal and phenol-preserved Montenegro antigen in Brazil. **Acta Trop 101**: 25-30.

Fagundes, A., Marzochi, M.C., Fernandes, O., Perez, M.A., Schubach, A.O., Schubach, T.M., Amendoeira, M.R., Mouta-Confort, E. and Marzochi. K.B. 2007b. First encounter of subclinical human Leishmania (Viannia) infection in State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz 102**: 1003-5.

Fagundes, A. 2007c. A reação intradérmica de Montenegro na clínica e na epidemiologia da leishmaniose tegumentar. **Tese [Doutorado em Vigilância Sanitária], Fundação Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, RJ.

Ferreira, M.P., A.M. Roselino, M.M. Nascimento, J.M. Aires, and J.F. Figueiredo. 2006. Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-L. brasiliensis antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo 48**: 215-7.

Furtado, T. 1980. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An Bras de Dermatol 55**: 81-86.

Furtado, T., and J. B. F. Vieira. 1982. Geografia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **An Bras Dermatol 57**: 135-140.

Goncalves, C.C., E.M. Reiche, B.A. De Abreu Filho, T.G. Silveira, T.C. Felizardo, K.R. Maia, R. Costacurta, E.J. Padovesi, B.P. Dias Filho, S.I. Jankevicius, and J.V. Jankevicius. 2002. Evaluation of antigens from various Leishmania species in a

Western blot for diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** **66**: 91-102.

Grimaldi, G., Jr. 1982. [Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects]. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **77**: 195-215.

Grimaldi Jr., G., and R.B. Tesh. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev** **6**: 230-50.

Grimaldi Jr, G. 2008. The utility of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and other non-human primate models for preclinical testing of *Leishmania* candidate vaccines. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **103**: 629-44.

Guimarães, M.C., B.J. Celeste, M.E. Camargo, and J.M. Diniz. 1983. Seroepidemiology of cutaneous leishmaniasis from Ribeira do Iguape Valley. IgM and IgG antibodies detected by means of an immunoenzymatic assay (ELISA). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **25**: 108-12

Guimarães, M.C., B.J. Celeste, E.L. Franco, L.C. Cuce, and W. Belda, Jr. 1989. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. **Bull World Health Organ** **67**: 643-8.

Guimarães, M.C., B.J. Celeste, and Franco, E.L. 1990. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. **Bull World Health Organ** **68**: 39-43.

Guimarães, M.C., and B.J. Celeste. 1991. Performance indexes of a dot-enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) and an enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) for field surveys of New World leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **33**: 385-9.

Harith, A.E., A.H. Kolk, P.A. Kager, J. Leeuwenburg, R. Muigai, S. Kiugu, and J.J. Laarman. 1986. A simple and economical direct agglutination test for serodiagnosis and sero-epidemiological studies of visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **80**: 583-36.

Hepburn, N.C. 2000. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Dermatol** **25**: 363-370.

Hepburn, N.C. 2003. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **J Postgrad Med** **49**: 50-4.

Hommel, M.T. 1976. Enzymoimmunoassay in leishmaniasis 15-16. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **60** : 15-16.

Hommel, M. 1978. The Genus *Leishmania*: Biology of the Parasites and Clinical Aspects. **Bulletin de L'Institute Pasteur** **75**: 5-102.

Jensen, A.T.R., A. Gaafar, A. Ismail, C.B.V. Christensen, M. Kemp, A.M. el Hassan, A. Kharazmi, and T.G. Theander. 1996. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. **Am J Trop Med Hyg** **55**: 490-495.

Ji, J., J. Masterson, J. Sun, and L. Soong. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol** **174**: 7147-53.

Jones DE, Elloso MM, Scott P. 1998. Host susceptibility factors to cutaneous leishmaniasis. **Front Biosci.** **15**;3: D1171-80.

Kamhawi, S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes Infect** **2**: 1765-73.

Kamhawi, S., Y. Belkaid, G. Modi, E. Rowton, and D. Sacks. 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science** **290**: 1351-4.

Kar, K. 1995. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit Rev Microbiol** **21**: 123-52.

Kima, P.E., S.L. Constant, L. Hannum, M. Colmenares, K.S. Lee, A.M. Haberman, M.J. Shlomchik, and D. McMahon-Pratt. 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med** **191**: 1063-8.

Labrada, M., K. Weigle, L. Valderrama, and N.G. Saravia. 1989. [Evaluation of immunoglobulin isotype specific to *Leishmania* in tegumentary American leishmaniasis]. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **84**: 409-416.

Lainson, R., and J.J. Shaw. 1970. Leishmaniasis in Brazil. V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **64**: 654-67.

Lainson, R., and J.J. Shaw. 1987. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120, In W. Peters and K. Killick-Kendrick, eds. **The leishmaniasis in biology and medicine, Vol. 1**. Academic Press, London.

Lindenberg, A. 1909. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. **Bull Soc Pathol Exot** **2**: 252-254.

Madeira, M.F., F.B. Figueiredo, A.G. Pinto, L.D. Nascimento, M. Furtado, E. Mouta-Confort, C.C. de Paula, A. Bogio, M.C. Gomes, A.M. Bessa, and S.R. Passos. 2009. Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Is intact skin a good target? **Res Vet Sci.** **87**(2):260-2.

Marzochi, M.C., S.G. Coutinho, P.C. Sabroza, and W.J. de Souza. 1980. [Indirect immunofluorescence reaction and intradermoreaction for American cutaneous leishmaniasis in residents of the Jacarepagua region (Rio de Janeiro). Comparative study of results observed in 1974 and 1978]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **22**: 149-55.

Marzochi, M.C.A. 1992. Leishmanioses no Brasil: As leishmanioses tegumentares. **J Bras Med** **63**: 82-104.

Marzochi, M.A.C., and K.B.F. Marzochi. 1994. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad de Saúde Pública** **10**: 359-375.

Marzochi, M.C.A., and K.B. Marzochi. 1997. Leishmanioses em áreas urbanas. **Rev Soc Bras Med Trop** **30**: 162-163.

Marzochi, K.B., M.A. Marzochi, A.F. Silva, N. Grativol, R. Duarte, E.M. Confort, and F. Modabber. 1998. Phase 1 study of an inactivated vaccine against American tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **93**: 205-212.

Masuda, A., S.F. do Nascimento, C.S. Guerra, S. Paranhos Gda, and A.W. Ferreira. 1989. Analysis of the specificity of human antibodies to antigens of *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **31**: 228-34.

Matos, G.I., J. Covas Cde, C. Bittar Rde, A. Gomes-Silva, F. Marques, V.C. Maniero, V.S. Amato, M.P. Oliveira-Neto, S. Mattos Mda, C. Pirmez, E.P. Sampaio, M.O. Moraes, and A.M. Da-Cruz. 2007. IFNG +874T/A polymorphism is not associated with American tegumentary leishmaniasis susceptibility but can influence *Leishmania* induced IFN-gamma production. **BMC Infect Dis** **7**: 33.

Maurer, M., S. Lopez Kostka, F. Siebenhaar, K. Moelle, M. Metz, J. Knop, and E. von Stebut. 2006. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. **Faseb J** **20**: 2460-7.

Mayrink, W., C. Chiari, P.A. Magalhaes, and C.A. da Costa. 1972. [Latex test in the diagnosis of American kala-azar]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **14**: 273-6.

Mendez, S., S.K. Reckling, C.A. Piccirillo, D. Sacks, and Y. Belkaid. 2004. Role for CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. **J Exp Med** **200**: 201-10.

Mendonca, S.C., S.G. Coutinho, R.R. Amendoeira, M.C. Marzochi, and C. Pirmez. 1986. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. **Clin Exp Immunol** **64**: 269-76.

Menezes, M.J., D.J. Costa, J. Clarencio, J.C. Miranda, A. Barral, M. Barral-Netto, C. Brodskyn, and C.I. de Oliveira. 2008. Immunomodulation of human monocytes following exposure to *Lutzomyia intermedia* saliva. **BMC Immunol** **9**: 12.

Menzel, S. and U. Bienzle. 1978. Antibody responses in patients with cutaneous leishmaniasis of the Old World. **Tropenmed Parasitol** **29**: 194-7.

Miles, S.A., S.M. Conrad, R.G. Alves, S.M. Jeronimo, and D.M. Mosser. 2005. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J Exp Med** **201**: 747-54.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, pp. 13, 2ª ed. Brasília, 2007

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília, 2006.

Monjour, L., C. Mille, P. Druilhe, and M. Gentilini. 1978. [Use of counterimmunoelectrophoresis on cellulose acetate membrane for the diagnosis of human and animal visceral leishmaniasis]. **Ann Soc Belg Med Trop** 58: 293-300.

Montenegro, J.B. 1926. A cutis reação na leishmaniose. **An Fac Med de São Paulo** 1: 323-330.

Montoya, J., C. Jaramillo, G. Palma, T. Gomez, I. Segura, and B. Travi. 1990. Report of an epidemic outbreak of tegumentary leishmaniasis in a coffee- growing area of Colombia. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 85: 119-21.

Montoya, Y., J. Arevalo, J. Gomez, A. Llanos Cuentas, and D.C. Barker. 1993. Genes coding for antigens recognized by sera from Andean cutaneous leishmaniasis patients from Peru. **Arch Inst Pasteur Tunis** 70: 397-403.

Morgado, F.N., A. Schubach, C.M. Rosalino, L.P. Quintella, G. Santos, M. Salgueiro, and F. Conceicao-Silva. 2008. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **Br J Dermatol** 158: 50-8.

Moreira, Juliano. Distribuicao geografica. **Gazeta Médica**, Bahia, 1895.

Mouta-Confort, E. 1991. Fator excretado e antígenos glicolipídicos de *Leishmania* do Novo Mundo: purificação parcial e antigenicidade em infecções humanas. **Dissertação de mestrado em Biologia Parasitária**. Fundação Oswaldo Cruz.

Nascimento, L.D., S.R. Passos, E. Mouta-Confort, A. Santiago Mde, A.S. Alves, F. Madeira Mde, O. Schubach Ade, and M.C. Marzochi. 2009. Comparative study of amplification systems in immunoenzyme assays for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **J Clin Lab Anal** 23: 152-6.

Noguchi, H. 1926. Comparative studies of *Herpetomonas* and *Leishmanias*. II - Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. **J Exp Med** 44: 327.

Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. 2007. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*Viannia*) in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 76: 573-8.

Oddo, F.G., and G. Cascio. 1963. [The immuno-fluorescence test in visceral and cutaneous leishmaniasis]. **Riv Ist Sieroter Ital** 38: 139-45.

O'Neil CE, Labrada M, Saravia NG. 1993. *Leishmania* (*Viannia*) panamensis-specific IgE and IgA antibodies in relation to expression of human tegumentary leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** 49(2): 181-8.

- Pagano, M., and G. Kimberlee. 2004. **Princípios de Bioestatística**. 2a edição. Tomson. ed., São Paulo.
- Pirmez, C., M.C. Marzochi, and S.G. Coutinho. 1988. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). **Mem Inst Oswaldo Cruz** **83**: 145-151.
- Pirmez, C., M. Yamamura, K. Uyemura, M. Paes-Oliveira, F. Conceição-Silva, and R.L. Modlin. 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Investig** **91**: 1390-1395.
- Pirmez, C., V. da Silva Trajano, M. Paes-Oliveira Neto, A.M. da-Cruz, S.C. Goncalves-da-Costa, M. Catanho, W. Degrave, and O. Fernandes. 1999. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol** **37**: 1819-23.
- Porstmann, T., and S.T. Kiessig. 1992. Enzyme immunoassay techniques. An overview. **J Immunol Methods** **150**: 5-21.
- Quintella, L.P., T. Cuzzi, F. Madeira Mde, T. Okamoto, and O. Schubach Ade. 2009. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania* (L.) chagasi hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **51**: 83-6.
- Rey-Ladino, J.A., P.B. Joshi, B. Singh, R. Gupta, and N.E. Reiner. 1997. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. **Exp Parasitol** **85**: 249-63.
- REY, L. Parasitologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- Ribeiro-Gomes, F.L., A.C. Otero, N.A. Gomes, M.C. Moniz-De-Souza, L. Cysne-Finkelstein, A.C. Arnholdt, V.L. Calich, S.G. Coutinho, M.F. Lopes, and G.A. DosReis. 2004. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **J Immunol** **172**: 4454-62.
- Rocha, P.N., R.P. Almeida, O. Bacellar, A.R. de Jesus, D.C. Filho, A.C. Filho, A. Barral, R.L. Coffman, and E.M. Carvalho. 1999. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis** **180**: 1731-4.
- Rodriguez, V., M. Centeno, and M. Ulrich. 1996. The IgG isotypes of specific antibodies in patients with American cutaneous leishmaniasis; relationship to the cell-mediated immune response. **Parasite Immunol** **18**: 341-5.
- Roffi, J., J.P. Dedet, P. Desjeux, and M.T. Garre. 1980. Detection of circulating antibodies in cutaneous leishmaniasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Am J Trop Med Hyg** **29**: 183-9.
- Romero, G.A., M.V. Guerra, M.G. Paes, and V.O. Macedo. 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **Am J Trop Med Hyg** **65**: 456-465.

Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes **MG**, Macêdo Vde O, Shaw JJ. 2002. Identification of antigenically distinct populations of *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta Trop** **2002**; **82**(1): 25-9.

Romero, G.A., M. de la Gloria Orge Orge, M.V. de Farias Guerra, M.G. Paes, V. de Oliveira Macedo, and E.M. de Carvalho. 2005. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Trop** **93**: 49-56.

Rubenstein, K.E., R.S. Schneider, and E.F. Ullman. 1972. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. **Biochem Biophys Res Commun** **47**: 846-51.

Ryan, J.R., A.M. Smithyman, G.H. Rajasekariah, L. Hochberg, J.M. Stiteler, and S.K. Martin. 2002. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol** **40**: 1037-43.

Saravia, N.G., L. Valderrama, M. Labrada, A.F. Holguin, C. Navas, G. Palma, and K.A. Weigle. 1989. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J Infect Dis** **159**: 725-35.

Sato, N., S.K. Ahuja, M. Quinones, V. KostECKI, R.L. Reddick, P.C. Melby, W.A. Kuziel, and S.S. Ahuja. 2000. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. **J Exp Med** **192**: 205-18.

Schubach, A., F. Haddad, M.P. Oliveira-Neto, W. Degrave, C. Pirmez, G. Grimaldi, Jr., and O. Fernandes. 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **J Infect Dis** **178**: 911-4.

Schubach, A., T. Cuzzi-Maya, A.V. Oliveira, A. Sartori, M.P. de Oliveira-Neto, M.S. Mattos, M.L. Araujo, W.J. Souza, F. Haddad, A. Perez Mde, R.S. Pacheco, H. Momen, S.G. Coutinho, M.C. de Almeida Marzochi, K.B. Marzochi, and S.C. da Costa. 2001. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **96**: 987-96.

Schur, P.H. 1987. IgG subclasses--a review. **Ann Allergy** **58**: 89-96, 99.

Sergent, E., E. Sergent, L. Parrot, A. Donatien, and M. Béguet. 1921. Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (*Phlebotomus papatasi*). **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences** **173**: 1030-1032.

- Shaw, J.J., and R. Lainson. 1977. A simply prepared amastigote leishmanial antigen for use in indirect fluorescent antibody test for leishmaniasis. **J Parasitol** **63**: 384-385.
- Silveira, F.T., Lainson, R. and Corbett. C.E. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **99**: 239-51.
- Singh, S. 2006. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian J Med Res** **123**: 311-30.
- Soto, M., J.M. Requena, L. Quijada, and C. Alonso. 1996. Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. **Clin Diagn Lab Immunol** **3**: 387-91.
- Souza, W.J.S., S.G. Coutinho, M.C.A. Marzochi, L.M. Toledo, and M.V. Gottlieb. 1982. [Use of the indirect immunofluorescence test in the therapeutic follow-up of American cutaneous leishmaniasis]. **Mem do Inst Oswaldo Cruz** **77**: 247-253.
- Teixeira, M.J., J.D. Fernandes, C.R. Teixeira, B.B. Andrade, M.L. Pompeu, J. Santana da Silva, C.I. Brodskyn, M. Barral-Netto, and A. Barral. 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infect Immun** **73**: 1191-5.
- Titus, R.G., and Ribeiro J.M. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science** **239**: 1306-8.
- Tojal da Silva, A.C., Cupolillo, E. Volpini, A.C., Almeida, R. and Romero, G.A. 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Trop Med Int Health** **11**: 1388-98.
- Tolezano, J.E. 1994. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **89**: 427-34.
- Ulrich, M., Centeno, M., Z. Mattout, Z., and J. Convit, J. 1988. Serological patterns and specificity in American cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg** **39**: 179-84.
- Ulrich, M., Rodriguez, V Centeno, M. and Convit, J. 1995. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell anergy. **Clin Exp Immunol** **100**: 54-8.
- Vattuone, N.H., A. Szarfman, A. and Gonzalez Cappa S.M. 1973. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' disease). **J Trop Med Hyg** **76**: 45-7.
- Veras P.S., Welby-Borges M, de Santana CD, Nihei J, Cardillo F, de Freitas LA. 2006. *Leishmania amazonensis*: participation of regulatory T and B cells in the in vitro priming (PIV) of CBA/J spleen cells susceptible response. **Exp Parasitol** **2006** **113**(3): 201-5. Epub 2006 Mar 3.

- Vexenat Ade, C., Santana, J.M. and Teixeira A.R. 1996. Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania (viannia) braziliensis*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** **38**: 177-85.
- Vianna, G. 1911. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota preliminar). **Brazil Médico** **25**: 411.
- Vianna, G. 1912. Com. à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Bol Soc Brasil Dermat** **1**: 36-38.
- Vianna, G. 1914. Sobre o tratamento da leishmaniose tegumentar. **Ann Paulistas de Med e Cirurgia II**: 167-169.
- Vidigal Cde, P., V.M. Marcussi, L.M. Marcussi, J.M. Mikcha, S.M. Arraes, M.V. Lonardon, and T.G. Silveira. 2008. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop** **107**: 208-12.
- Voller, A., and D.E. Bidwell. 1975. A simple method for detecting antibodies to rubella. **Br J Exp Pathol** **56**: 338-9.
- Voller, A., A. Bortlett, and D.E. Batwell. 1976. Enzyme immunoassays for parasite diseases. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **70**: 98-106.
- Voller, A. 1978. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (theory, technique and applications). **Ric Clin Lab** **8**: 289-98.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. 1978 Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **J Clin Pathol**; 31(6): 507-20
- Von Stebut, E. 2007. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **Eur J Dermatol** **17**: 115-22.
- Wagener, E.H. 1923. A skin reaction to extracts of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum*. **Univ. C. Publ. Zool.** **20**: 477-488.
- Walker L, Johnson GD, MacLennan IC. 1983. The IgG subclass responses of human lymphocytes to B-cell activators. **Immunol**; **50**(2): 269-72.
- Wanase, N., Xin, L. and Soong, L. 2008. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. **Int J Parasitol** **38**: 417-29.
- Weigle, K.A., de Davalos, M. P. Heredia, P., Molineros, R., Saravia, N.G. and D'Alessandro, A. 1987. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am J Trop Med Hyg** **36**: 489-96.
- World Health Organization. 2009. Review, The Cochrane Collaboration 2009, Issue 2 by U. González, M. Pinart, M. Rengifo-Pardo, A. Macaya, J. Alvar, J. A. Tweed. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>

Williams, K.M., Sacci, J.B and Anthony, R.L. 1986. Characterization and quantitation of membrane antigens of New World Leishmania species by using monoclonal antibodies in Western blot and flow microfluorometric assays. **J Protozool** **33**: 490-7.

Woelbing, F., Kostka, S.L. Moelle, K. Belkaid, Y. Sunderkoetter, C Verbeek, S. Waisman, A. Nigg, A.P. Knop, J. Udey, M.C. and von Stebut, E. 2006. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **J Exp Med** **203**: 177-88.

Yoneyama, K.A., de Peder L.D., Lonardoni, M.V. and Silveira, T.G. 2007. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay in patients from Northern Parana State, Brazil. **Braz J Infect Dis** **11**: 360-4.

ANEXO I - APROVAÇÃO NO CEP/IPEC



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Protocolo 0032.0.009.000-07

1. Identificação:

Título do Projeto: "Avaliação do Ensaio Imunoenzimático, ELISA (IgG e Subclasses Específicas) e da Identificação e Caracterização de Antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Reconhecidos por Subclasses de IgG no Diagnóstico e Acompanhamento de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana".

Pesquisador Responsável: Doutoranda Eliame Mouta Confort.

Orientador: Armando de Oliveira Schubach.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ

Data de Apresentação ao CEP: 14/05/2007.

2. Sumário:

Serão estudados os pacientes, em diferentes faixas etárias, atendidos para diagnóstico diferencial com LTA no ambulatório do IPEC, cujo primeiro atendimento foi realizado no período de um ano entre março de 2005 e março de 2006. A investigação diagnóstica seguirá o protocolo do projeto: "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz", aprovado no CEP/IPEC com o número 0016.0.009-02. Tem como objetivo avaliar o comportamento do teste sorológico, ELISA (IgG total e subclasses), para detecção de anticorpos anti-*L. (V.) braziliensis*, e do immunoblotting", para identificação e caracterização de antígenos de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* reconhecidos por subclasses de IgG, em pacientes com LTA ou com outras doenças que necessitem diagnóstico diferencial com LTA. Considerando a série histórica de casos atendidos e notificados pelo IPEC, espera-se incluir cerca de 60 casos de LTA e 100 pacientes com diagnóstico diferenciais. A população do estudo será constituída por indivíduos com diagnóstico parasitológico de leishmaniose tegumentar americana com formas cutâneas (LC), mucosa (LM), e cutâneomucosa (LCM) atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Além, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado no projeto principal: "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA – IPEC, por se tratar de um estudo envolvendo material estocado foi elaborado também, um Termo de Compromisso e Responsabilidade, onde o pesquisador se compromete manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto. Os recursos necessários ao desenvolvimento do projeto são oriundos do projeto de pesquisa: "Avaliação da persistência do parasito em pacientes de leishmaniose tegumentar americana e

"Avaliação do Ensaio Imunoenzimático, ELISA (IgG e Subclasses Específicas) e da Identificação e Caracterização de Antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Reconhecidos por Subclasses de IgG no Diagnóstico e Acompanhamento de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana".

correlações epidemiológicas" / CNPq com coordenação de Armando de Oliveira Schubach.

4. Diligências:

Sim. Atualização do cronograma; Informar melhor como os sujeitos desta pesquisa serão estratificados nos diferentes grupos de estudo propostos, bem como a faixa etária dos mesmos. Os critérios de exclusão devem ser mais bem definidos. Foram satisfeitas.

5. Parecer:

APROVADO.

Data: 31 de outubro de 2007.

Assinatura do Coordenador:



Dr.ª Léa Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

ANEXO II - PROTOCOLO DE ATENDIMENTO CLÍNICO

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz Centro de Referência Nacional em LTA - Fiocruz/Funasa

Rotina para o Atendimento de Pacientes

Critério clínico para encaminhamento de pacientes para o Centro de Referência

Paciente proveniente de área endêmica ou suspeita; apresentando lesão cutânea ulcerosa ou tuberosa, única ou múltipla, com evolução superior a 30 dias; com ou sem adenopatia associada e reação de Montenegro positiva (superior a 5 mm de endureção).

Outros pacientes provenientes de área endêmica, porém, de difícil diagnóstico: apresentando lesões sugestivas e reação de Montenegro negativa; adenomegalia localizada sem lesão cutânea; má resposta ou recidiva após um primeiro tratamento para LTA.

Rotina para Diagnóstico Clínico-Laboratorial (pré-tratamento)

Avaliação clínica e dermatológica: Exame clínico geral e exame dermatológico com descrição e documentação fotográfica das lesões.

Avaliação otorrinolaringológica: Realizada com fibra ótica, para descrição e documentação fotográfica das lesões.

Sangue:

Sorologias para LTA, VDRL, Paracoccidiodomicose, histoplasnose, eletroforese de hemoglobina (úlceras de perna)

Hemograma

Bioquímica: glicose, uréia, creatinina, TGO, TGP, fosfatase alcalina, gama GT, amilase, lipase

Coagulograma (pacientes com indicação de biópsia mucosa)

Eletrocardiograma (ECG)

Reações intradérmicas: PPD e Montenegro (nos casos negativos inicialmente)

Aspirado do bordo da lesão cutânea e / ou de gânglio periférico:

Direto no tubo à vácuo (cultura para *Leishmania*)

Após injeção de 0,1 ml de salina estéril (com antibiótico) 0,9% no tubo à vácuo (cultura para *Leishmania*)

Biópsia cutânea e/ou mucosa e / ou de gânglio periférico:

Formol (histopatologia)

Solução salina estéril (cultura para fungos e micobactéria)

Solução salina estéril com antibiótico (cultura para *Leishmania*)

Imprint em lâmina de vidro

Congelação a -70°C (imunopatologia)

Radiografia do tórax e dos seios da face (rotina apenas nos casos mucosos)

Outros exames: direcionados pela história e/ou exame clínico

Tratamento Padrão

Medidas Gerais:

Tratamentos para outras doenças concomitantes como hipertensão arterial, diabetes etc. deverão, preferencialmente, ser iniciados antes ou durante a investigação diagnóstica, a fim de iniciarmos o tratamento específico com o paciente o mais compensado possível.

A infecção secundária deverá ser tratada com cuidados locais (água, sabão de coco e anti-sépticos) e, se necessário, antibióticos orais, pelo menos, na semana que anteceder à biópsia de pele, a fim de diminuir a contaminação bacteriana das culturas para *Leishmania*.

No caso da presença de crostas e obstrução nasal, as cavidades nasais deverão ser instiladas com solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% por várias vezes ao dia durante todo o período do acompanhamento, a fim de possibilitar uma boa visualização das mucosas das cavidades nasais, assim como o alívio sintomático do paciente.

Nos casos de lesões abaixo dos joelhos, o repouso com os membros inferiores elevados durante o maior tempo possível, é um excelente método terapêutico auxiliar.

Medidas específicas:

Em princípio, todos os pacientes deverão ser tratados, ambulatorialmente, com antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®) na dosagem de 5 mg Sb⁵⁺/kg/dia¹ IM. A administração EV, quando indicada para diminuir o desconforto local, deverá ser realizada, de preferência, em ambiente hospitalar. Pacientes idosos ou apresentando outras complicações clínicas, poderão ser tratados em regime de internação ou de hospital-dia.

O antimoniato de N-metil-glucamina (antimoniato de meglumina) é apresentado em ampolas de 5ml contendo 1,5g de N-metil-glucamina, equivalente a 405mg de Sb⁵⁺. Portanto, 5ml correspondem a 405mg de Sb⁵⁺ e cada ml a 81mg de Sb⁵⁺.

Os pacientes com a **forma cutânea** serão tratados inicialmente durante 30 dias. Caso seja indicado, o tratamento poderá ser prorrogado, na mesma dosagem, por mais 10 a 30 dias consecutivos (ver acompanhamento clínico).

Os pacientes com a **forma mucosa** serão tratados por um mínimo de 30 dias, porém o tratamento será continuado, preferencialmente sem interrupção, até a epitelização e/ou desinfiltração das mucosas.

Pacientes com lesões na laringe ou com extensas lesões nas vias aéreas e digestivas superiores deverão ser internados a fim de prevenir a instalação de um quadro de insuficiência respiratória por edema local, mais provável de ocorrer na primeiras 72 horas após início do tratamento. A profilaxia com corticosteróides deverá ser iniciada antes da primeira dose do tratamento específico. Utiliza-se hidrocortisona 100mg EV 6/6h durante um mínimo de 24 horas e descontinuada durante os próximos dois dias,

Pacientes que necessitem interromper temporariamente o tratamento por toxicidade, ao recomeçar, deverão dar seqüência ao tratamento a partir da última dose administrada, como se não tivesse havido qualquer interrupção.

¹ Exemplo de cálculo de dose para um paciente de 60 kg:

5 mg Sb⁵⁺/kg/dia = 300 mg Sb⁵⁺/dia = 3,7 ml/dia, arredondando, = 3,5 ml/dia EV ou IM.

20 mg Sb⁵⁺/kg/dia = 1200 mg Sb⁵⁺/dia = 14,8 ml/dia, arredondando, = 15 ml/dia EV ou IM.

Os casos de lesões recidivantes e as possíveis evoluções para forma mucosa (ver acompanhamento clínico), deverão ser retratadas, inicialmente, com a mesma dosagem e pelo mesmo período que os pacientes virgens de tratamento, porém se possível, em regime de internação ou hospital-dia.

Em caso de insucesso no segundo tratamento, avaliar a possibilidade de utilização da dose de 20mg Sb⁵⁺/kg/dia ou de outra droga como a anfotericina B ou a pentamidina.

A anfotericina B deverá ser diluída em solução de glicose 5% a uma concentração de 0,1mg/ml (não utilizar soluções contendo eletrólitos). A administração deve ser diária ou em dias alternados, por um período de 1 a 4 horas de infusão endovenosa. A dose inicial é de 0,3-0,5mg/Kg/dia aumentando-se progressivamente até 1mg/Kg/dia, até alcançar a dose máxima diária de 50mg. As doses totais recomendadas são de 1 a 1,5g para LC e, de 2,5 a 3g para LM.¹⁻⁶

A Pentamidina pode ser encontrada sob a formulação de mesilato e de isotionato, em frascos/ampolas contendo 300mg. A formulação de isotionato costuma ser melhor tolerada.⁷⁻¹⁰ A droga deve ser administrada após a alimentação devido a sua ação hipoglicemiante. A dose habitual é de 2-4mg/Kg, IM, em dias alternados durante 5 a 25 semanas, ou por período mais prolongado se necessário.¹¹⁻¹³ O Ministério da Saúde recomenda que a dose total não ultrapasse 2g.¹ e alguns autores têm utilizado esquemas curtos com sucesso¹⁴

Pacientes com uma ou duas lesões cutâneas, que por qualquer motivo apresentem impossibilidade de receber medicação parenteral regular ou que apresentem sinais de toxicidade importante à medicação sistêmica, poderão ser submetidos a tratamento intralesional com N-metil-glucamina.

Rotina de acompanhamento

Exames laboratoriais para monitorização da toxicidade:

Hemograma, glicose, uréia, creatinina, TGO, TGP, fosfatase alcalina, gama GT, amilase, lipase e ECG deverão ser realizados durante o tratamento a cada 7, 10 ou 15 dias; imediatamente após o tratamento; e depois, apenas os exames alterados, até a sua normalização. Em casos de alterações persistentes ou rapidamente progressivas, recomenda-se a suspensão temporária do tratamento até a normalização dos exames.

Para **Anfotericina B** acrescentar dosagens de Na e K e utilizar intervalos de uma semana ou menos.

Ao utilizar-se a **Pentamidina**, a glicemia deve ser acompanhada mensalmente durante 6 meses sempre que a dose total ultrapassar 1g.

Sorologias para LTA: Deverão ser realizadas em todas as consultas de retorno.

Quando as consultas forem realizadas em outros locais, o sangue deverá ser centrifugado e o soro poderá ser transportado imediatamente em isopor com gelo ou estocado congelado (preferencialmente a -20°C) e posteriormente transportado em isopor com gelo para o laboratório.

Sorologia anti-HIV: Deverá ser solicitada nos casos de evolução aberrante (lesões fora do padrão clínico usual, apresentando exuberância parasitária, teste de Montenegro não reator etc.) e má resposta terapêutica.

Acompanhamento clínico

Casos cutâneos

Avaliação clínica e dermatológica:

Devem ser repetidas a cada 15, 10 ou 7 dias durante o tratamento, de acordo com as condições clínicas do paciente, e no 30^o dia.

Ao término do tratamento espera-se que as lesões estejam com pouquíssima infiltração (não endurecidas à palpação) e epitelizadas (recoberta por uma "pele fina"), embora mantenham algum eritema (cicatriz rósea).

Nos casos em que não ocorra epitelação das lesões (geralmente úlceras localizadas abaixo dos joelhos), manter sem tratamento (apenas cuidados locais) e reavaliar quinzenalmente. Caso não ocorra uma tendência progressiva para a epitelação, reavaliar o diagnóstico (principalmente nos casos sem comprovação parasitológica) e/ou a necessidade de repetir o tratamento.

A partir da constatação da epitelação das lesões, os pacientes deverão ser reavaliados após 1, 3, 6, 12 meses e então anualmente, pelo mínimo de 5 anos.

Avaliação otorrinolaringológica

Nos pacientes sem lesão mucosa anterior ao tratamento, devem ser realizadas, no mínimo, com 6 e 12 meses e então anualmente, por um mínimo de 5 anos.

Casos mucosos

Avaliação clínica:

Devem ser repetidas a cada 15, 10 ou 7 dias durante o tratamento, de acordo com as condições clínicas do paciente, e no 30º dia. Caso haja indicação de prorrogação do tratamento as reavaliações devem seguir com a periodicidade necessária.

Avaliação otorrinolaringológica:

Após o 30º dia de tratamento deverão ser a cada 15, 10 ou 7 dias de prorrogação do tratamento, de acordo com as condições clínicas do paciente.

A partir da constatação da epitelização das lesões, os pacientes deverão ser reavaliados após 1, 3, 6, 12 meses e então anualmente, por um mínimo de 5 anos.

Recidivas de lesões e/ou evolução de um caso de forma cutânea para a forma mucosa

Pacientes com lesões recidivantes, deverão reiniciar a investigação diagnóstica (principalmente aqueles sem comprovação parasitológica) e/ou repetir o tratamento, de preferência em regime de internação ou hospital-dia.

Pacientes que evoluírem da forma cutânea para a forma mucosa, necessariamente deverão seguir a rotina de investigação inicial para pacientes mucosos.

Em ambos os casos, atentar para a possibilidade para a co-infecção pelo HIV ou outras doenças associadas de natureza infecciosa ou degenerativa.

Calendário para pacientes tratados em outras unidades de saúde

Pacientes de Forma Cutânea

MOMENTO	FREQÜÊNCIA	LOCAL
Confirmação do diagnóstico:		Centro de Referência
Durante o tratamento: Imediatamente após o tratamento:	a cada 15, 10 ou 7 dias no 30º dia	Unidade de origem Unidade de origem
Caso persista lesão não epitelizada:	quinzenalmente até a constatação da epitelização (dentro de mais 2 meses)	Unidade de origem
	caso persista a lesão aberta ou caso ocorra piora nesse período	Centro de Referência
Primeiro ano após o tratamento:	2 e 4 meses 1, 6 e 12 meses	Unidade de origem Centro de Referência
Anos subseqüentes:	anualmente durante no mínimo 5 anos	Centro de Referência

Pacientes de Forma Mucosa

MOMENTO	FREQÜÊNCIA	LOCAL
Confirmação do diagnóstico:		Centro de Referência
Durante o tratamento: Imediatamente após o tratamento:	a cada 15, 10 ou 7 dias no 30º dia	Unidade de origem Centro de Referência
Caso necessite prorrogar o tratamento:	a cada 7 ou 10 dias para acompanhamento clínico geral	Unidade de origem
	a cada 10 ou 15 dias até a constatação da cura clínica	Centro de Referência
Primeiro ano após o tratamento:	1, 3, 6 e 12 meses	Centro de Referência
Anos subseqüentes:	anualmente durante no mínimo 5 anos	Centro de Referência

Anexo II (do projeto rotina)

Ficha Projeto Rotina

Projeto: Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz
Início: CTC: 09/08/02 CEP/IPEC: protocolo 0016.0.009-02 aprovado em 04/11/02 Término previsto: indeterminado
Coordenador: Armando de Oliveira Schubach.
Fonte de Financiamento: Recursos orçamentários da Fiocruz e Convênio Fiocruz/SVS-MS (Centro de Referência Nacional LTA) Valor: R\$: 273.680,00
Linha de pesquisa: Diagnóstico e terapêutica das leishmanioses
Area temática:
Doença relacionada: Leishmaniose Tegumentar Americana
Aplicações potenciais: Este é o projeto base para todos os demais projetos do CRNLTA envolvendo diagnóstico e tratamento de pacientes, uma vez que sistematiza o atendimento de rotina
Laboratório envolvido/Unidade: Centro de Referência Nacional em LTA
Equipe: Armando de Oliveira Schubach, Médico infectologista e dermatologista, Doutor – Coordenador; Mauro Célio de Almeida Marzochi, Médico, Biólogo, Livre Docente, Parasitologista <i>Keyla B. Feldman Marzochi, Médico infectologista, Doutor – ex-Diretora IPEC;</i> <i>Aline Fagundes da Silva, Bióloga, Mestre, Doutoranda - IPEC;</i> Ana Cristina Martins, Médico Otorrinolaringologista, Doutoranda – IPEC; Cibele Baptista, Médico Veterinário, Mestre – IPEC; Cláudia Maria Valete Rosalino, Médico Otorrinolaringologista, Doutora – IPEC; Eliame Mouta Confort, Farmacêutica, Doutoranda -IPEC-FIOCRUZ; Ginelza Peres Lima dos Santos, Bióloga, Doutora – ENSP; João Soares Moreira, Médico Otorrinolaringologista, Doutorando – IPEC; <i>Maria de Fátima Madeira, Bióloga, Parasitologista, Doutora – ENSP;</i> Mariza Matos Salgueiro, Médica Estagiária; Tânia Maria Pacheco Schubach, Médico Veterinário, Doutor – IPEC; Tullia Cuzzi, Médico Patologista, Doutor – IPEC;

ANEXO III – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

ENDEREÇO: Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21045-900

TELEFONES (0xx21) 3865-9541 / 3865-9525 / 3865-9536 / FAX (0xx21) 3865-9541

NOME DO PROJETO DE PESQUISA: ESTUDO PARA A SISTEMATIZAÇÃO DO ATENDIMENTO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM LTA - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - FIOCRUZ

NOME DO VOLUNTÁRIO: _____

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que atinge seres humanos e animais, incluindo o cão, causada por parasitos chamados Leishmanias. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, tuberculose, sífilis, esporotricose, outras micoses, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e precisam ser diferenciadas para que se possa iniciar o tratamento correto. Entretanto, com os exames existentes atualmente, nem sempre se consegue ter certeza absoluta sobre qual a doença em questão.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? quais as melhores formas de tratamento? que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

Pelo presente documento, você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC-Fiocruz, com os seguintes objetivos:

Descrever aspectos da LTA: manifestações clínicas e exames de laboratório, tentando estabelecer padrões de apresentação da doença e seu modo de evolução, comparando com outras doenças.

Avaliar o uso dos antimoniais e outras drogas utilizadas no tratamento da LTA levando em consideração o tempo de tratamento, toxicidade, facilidade de administração, custo e ausência de envolvimento das mucosas do nariz e da garganta.

Isolar, identificar e comparar as leishmanias causadoras da LTA provenientes de diversas localidades.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da Instituição. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para o diagnóstico da sua doença, e que parte deste material, assim como os resultados destes exames de rotina, sejam utilizados neste estudo. Também será necessária a sua autorização: 1) para a utilização de documentação fotográfica

ou filmagem de suas lesões para estudo 2) para que parte do material coletado periodicamente para a realização de exames para acompanhamento da evolução da sua doença, assim como os resultados destes exames de rotina e do seu tratamento sejam utilizados neste estudo 3) para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir rigorosamente as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico todas as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para o Dr. Armando de Oliveira Schubach, Dra. Fátima Conceição-Silva ou Dra. Mariza Salgueiro nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz. Seus animais com suspeita de LTA poderão ser atendidos gratuitamente pela médica veterinária Dra. Tânia Maria Pacheco Schubach no Serviço de Zoonoses do IPEC.

Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante o tratamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

Antes do tratamento haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento da lesão de pele, de mucosa ou de "íngua" para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido doente e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias) quanto para pesquisa (identificação de células e outros componentes da resposta inflamatória, assim como novos métodos de identificação dos possíveis agentes da doença). Outros materiais também poderão ser coletados na tentativa de isolamento do agente causador da doença: aspiração com seringa e agulha do bordo da lesão e de secreções em lesões de pele fechadas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de serem confundidas com a LTA, para classificar a gravidade da doença e avaliar os efeitos dos medicamentos a serem utilizados durante o seu tratamento: um a quatro testes cutâneos (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para determinada doença na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista entre 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade equivalente a aproximadamente três colheres de sopa), exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário complementada por tomografia computadorizada); e eletrocardiograma.

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia, geralmente, durante um período de 30 dias contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime.

Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas dentro de 10, 20 e 30 dias. Caso as lesões não cicatrizem totalmente, o

tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Ao se atingir a cura clínica, você deverá retornar para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos).

A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma ou duas colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados.

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, os testes na pele poderão, apresentar uma reação forte com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

No local da biópsia poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos.

O medicamentos glucantime e pentamidina costumam causar efeitos indesejáveis, não devem ser utilizados na gravidez e seu uso em mulheres em idade reprodutiva deve ser acompanhado de uso de método anticoncepcional eficaz como preservativo de látex masculino ou feminino ("camisinha"), diafragma feminino ou anticoncepcional oral ("pílula"). Quando o tratamento não puder ser adiado, a anfotericina B poderá ser utilizada na gravidez. Os exames com raios-x também não devem ser realizados em grávidas.

Formas de ressarcimento:

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço social do IPEC para pacientes externos.

Benefícios esperados:

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não beneficiá-lo diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado a buscar o tratamento mais adequado para o seu caso.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

_____	_____
Nome paciente:	Data
_____	_____
Nome médico:	Data
_____	_____
Nome testemunha ² :	Data
_____	_____

² Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito. No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

ANEXO IV - TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, Eliame Mouta Confort, responsável pelo projeto de pesquisa intitulado “Avaliação dos ensaio imunoenzimático, ELISA (IgG e subclasses específicas) e da identificação e caracterização de antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, reconhecidos por subclasses IgG, no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana”, comprometo manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto cv.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, serão mantidos em um banco de dados sob a minha responsabilidade.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro,
