

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

JAMYRA IGLESIAS SILVA

**AVALIAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
EMPREGANDO FRAÇÕES SOLÚVEL E
ENRIQUECIDA COM MEMBRANA DE CEPA
INFECTIVA DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Rio de Janeiro

2009

**AVALIAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
EMPREGANDO FRAÇÕES SOLÚVEL E
ENRIQUECIDA COM MEMBRANA DE CEPA
INFECTIVA DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* PARA O
DIAGNÓSTICO DA LESIÃO TEGUMENTAR
AMERICANA**

JAMYRA IGLESIAS SILVA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação Stricto Sensu em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Dr.^a Sônia Regina Lambert Passos

Dr.^a Fernanda Carvalho de Queiroz Mello

Rio de Janeiro

2009

Iglesias, Jamyra

Avaliação do ensaio imunoenzimático empregando frações solúvel e enriquecida com membrana de cepa infectiva de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana / Jamyra Iglesias Silva. – Rio de Janeiro, 2009.

60 f.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, 2009.

Bibliografia: f. 37-50

1. ELISA 2. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 3. Confiabilidade e Validade. 4. Estudos de Validação. 5. Técnicas e Procedimentos Diagnósticos

JAMYRA IGLESIAS SILVA

**AVALIAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO
EMPREGANDO FRAÇÕES SOLÚVEL E
ENRIQUECIDA COM MEMBRANA DE CEPHA
INFECTIVA DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação Stricto Sensu em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadoras: Dr.^a Sônia Regina Lambert Passos

Dr.^a Fernanda Carvalho de Queiroz Mello

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Dr.^o Armando de Oliveira Schubach (Presidente)
Doutor em Biologia Parasitária / IOC

Dr.^a Maria de Fátima Madeira
Doutora em Biologia Parasitária / IOC

Dr.^a Léa Cysne Finkelstein
Doutora em Biologia Celular e Molecular / IOC

Dr.^o Carlos Augusto Ferreira de Andrade (Suplente)
Doutor em Saúde Pública / ENSP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças e possibilidades de realizar meu sonho.

À minha orientadora, Dr.^a Sônia Regina Lambert Passos pelo apoio, motivação e colaboração ao longo desses dois anos de curso.

À minha co-orientadora, Dr.^a Fernanda Carvalho de Queiroz Mello, que mesmo a distância auxiliou em minha orientação, com sugestões sempre pertinentes.

À Dr.^a Maria de Fátima Madeira que além do apoio laboratorial, sempre me apoiou e estimulou a seguir em frente.

À Ms. Eliame Mouta-Confort e Ms. Flávia Coelho Ribeiro que me auxiliaram nas técnicas laboratoriais.

Ao Dr. Marcelo da Silva Genestra e Dr.^a Léa Cysne-Finkelstein, do Instituto Oswaldo Cruz, que me auxiliaram em partes importantes do trabalho.

À minha família pela compreensão, apoio e estímulo ao longo de toda minha vida.

Iglesias J. **Avaliação do ensaio imunoenzimático empregando frações solúvel e enriquecida com membrana de cepa infectiva de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Rio de Janeiro, 2009. 60 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Introdução: O diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é baseado na visualização ou no isolamento em cultura, ambos são procedimentos demorados e com baixa sensibilidade. Alternativamente, devido à praticidade de execução o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) pode ser utilizado para detecção de imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania*. **Objetivo:** Avaliar a acurácia e a confiabilidade do ensaio imunoenzimático (ELISA) com frações solúvel (FS) e enriquecida com membrana (FM) de cepa em fase infectiva e não infectiva de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para o diagnóstico da LTA. **Método:** Estudo de validação de 152 amostras de soro, 76 de pacientes com LTA (diagnosticados por *imprint*, histopatologia ou cultura) e 76 controles com outros diagnósticos, selecionados randomicamente de uma coorte de 400 indivíduos investigados em um centro de referência no Rio de Janeiro, Brasil, entre 2005 e 2007. Para avaliar a confiabilidade (CCI), amostras randomicamente selecionadas foram testadas duas vezes e de forma mascarada para cada fração antigênica. Foram empregados antígenos obtidos de formas promastigotas infectivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/02/R.787) em fase estacionária de crescimento. Foram estabelecidos *cut-offs* para cada antígeno empregado utilizando-se gráficos de Receiver Operating Characteristic Curve (Curva ROC) e a performance dos testes foi comparada através de áreas sob a curva (AUC), sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo (VPP e VPN) e razões de verossimilhança (RV), utilizando-se o teste qui-quadrado e considerando-se valores de $p < 0,05$ como significativos. A confiabilidade foi analisada utilizando-se o coeficiente de correlação intraclassa (CCI). A amostra foi testada quanto a infectividade através da infecção em cultura de macrófagos (55^a. passagem em cultura), lise pelo sistema complemento (7^a., 61^a. e 68^a. passagens em cultura) e produção de óxido nítrico por *Leishmania* (5^a., 32^a. e 66^a. passagens em cultura). **Resultados:** Os *Cut-offs* foram 0,22 (FS) e 0,33 (FM). Ambas as frações discriminaram bem os doentes com AUCs elevadas ($p < 0,0001$) e não houve diferença entre as frações ($p = 0,45$). A sensibilidade foi 89,5% para ambas as frações e a especificidade foi 89,5 (FS) e 93,4 (FM); RV+ foi 8,5 (FS) e 13,6 (FM) e os CCIs foram excelentes (FS: 0,96 e FM: 0,90) A amostra permaneceu infectiva até a 68^a. passagem, apresentando 7,5% de formas metacíclicas infectantes. A diminuição na produção de óxido nítrico indica que a cepa estava perdendo infectividade. **Conclusão:** Ambos os antígenos da cepa infectiva ofereceram excelente precisão e acurácia diagnostica para LTA, sugerindo que a escolha possa recair sobre a FS por aspectos de custo e praticidade de execução. A cepa não perdeu a sua infectividade.

Palavras-Chave: 1. ELISA. 2. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 3. Confiabilidade e Validade. 4. Estudos de validação. 5. Técnicas e procedimentos diagnósticos

Iglesias J. **Evaluation of Immunoenzymatic Assay for diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis using soluble and enriched membrane fractions from infective *Leishmania (Viannia) braziliensis***. Rio de Janeiro, 2009. 60 f. Master [Science Dissertation of Clinic Research of Infection Disease] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Background: The diagnosis of American tegumentary leishmaniasis (ATL) is based on the identification or isolation of the parasite, which is time-consuming and has low sensitivity. Alternatively, due to feasibility an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) may be used for the detection of anti-*Leishmania* IgG. **Objective:** To evaluate the accuracy and reliability of the ELISA using soluble (SF) and membrane-enriched (MF) antigen fractions from an infective and non infective strain of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Methods:** Validation study of 152 serum samples, 76 from patients with ATL (diagnosed by imprint, culture or histopathology) and 76 controls with other diagnoses, randomic selected of a cohort of 400 individuals investigated at a referral center in Rio de Janeiro, Brazil, between 2005 and 2007. To assess reliability (ICC), randomic selected samples were tested twice and masked with each antigenic fraction. Antigens used were obtained from infective promastigotes forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/02/R.787) in the stationary phase. Cut-off values were established for each antigens employed based on Receiver Operating Characteristic Curve (ROC curve) and the performance of the testes was compared by areas under the curve (AUC), sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV and NPV) and likelihood ratios (LR) were compared using chi-square test and considering significant values of $p < 0,05$. Reliability was analysed with intraclass correlation coefficient (ICC). Infectivity of the strain was tested by infection on macrophages culture (55^a. passage in culture), complement lysis (7^a., 61^a. e 68^a. passages in culture) e production of nitric oxide by *Leishmania* (5^a., 32^a. e 66^a. passages in culture) **Results:** Cut-off values of 0.22 (SF) and 0.33 (MF) were defined. Fractions provided good discrimination between patients, with a large area under the curve ($p < 0.0001$), and there was no difference between fractions ($p = 0.45$). Sensitivity was 89.5% for both fractions and specificity was 89.5% (SF) and 93.4% (MF); + LR was 8.5 (SF) and 13.6 (MF) and ICCs were excellent (SF: 0.96 and MF: 0.90). The sample remain infective until 68^a. passage, showing 7,5% of metacíclicas forms. Decrease of nitric oxide production reflects loss of infectivity of strain. **Conclusion:** Both antigens tested provided precision and accuracy for the diagnosis of ATL, with SF being recommended due to its lower cost and greater feasibility. Strain didn't lost infectivity.

Key-words: 1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. 2. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 3. Reliability and Validity. 4. Validation studies [type of studies]. 5. Diagnostic techniques and procedures

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Curva de crescimento da cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> em fase infectiva	23
Figura 2 – Curva de crescimento da cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> na 55 ^a . passagem em cultura	24
Figura 3 – Curva ROC dos testes ELISA utilizando as frações solúvel (FS) e enriquecida com membrana (FM) da cepa infectiva de <i>Leishmania braziliensis</i>	25
Figura 4 – Distribuição dos valores de Densidade Ótica, valor de <i>cutt-off</i> , sensibilidade e especificidade da fração solúvel da cepa infectiva de <i>Leishmania braziliensis</i>	25
Figura 5 – Distribuição dos valores de Densidade Ótica, valor de <i>cutt-off</i> , sensibilidade e especificidade da fração enriquecida com membrana da cepa infectiva de <i>Leishmania braziliensis</i>	26
Figura 6 – Concentração de óxido nítrico/nitrito em sobrenadantes de cultivo de promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> (6×10^6 /mL)	29
Tabela 1 – Distribuição de frequência do diagnóstico dos pacientes do grupo controle (N=76)	23
Tabela 2 – Dados comparativos de acurácia do ELISA empregando frações solúvel e enriquecida com membrana da cepa infectiva de <i>Leishmania braziliensis</i> para Leishmaniose Tegumentar	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AUC	Area Under the Curve (Área Sob a Curva)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dp	Desvio Padrão
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FM	Fração Enriquecida com Membrana
FS	Fração Solúvel
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
CCI	Coeficiente de Correlação Intraclasse
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN	Interferon
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de Potássio
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween
PBS-TL	Phosphate Buffered Saline-Tween Leite
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride
RIA	Radioimunoensaio com Anticorpo

ROC	Receiver Operating Characteristic Curve
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RV+	Razão de Verossimilhança Positiva
RV-	Razão de Verossimilhança Negativa
SFB	Soro Fetal Bovino
STARD	Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy
TNF	Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 AS LEISHMANIOSES: aspectos gerais	1
1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	2
1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	3
1.4 IMUNOPATOGÊNESE	6
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	8
3. OBJETIVOS	10
3.1 OBJETIVO GERAL	10
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
4. METODOLOGIA	12
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	12
4.3 POPULAÇÃO DE ESTUDO	13
4.4 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	13
4.5 TAMANHO AMOSTRAL	14
4.6 ALEATORIZAÇÃO E MASCARAMENTO	14
4.7 CONFIABILIDADE	14
4.8 PROCEDIMENTOS	14
4.8.1 Coleta da amostra	14
4.8.2 Revisão de Prontuários	15
4.8.3 Parasitas e antígenos utilizados nos testes	15

4.8.3.1 Curva de crescimento da amostra em fase infectiva e não infectiva	16
4.8.3.2 Repique para obtenção dos antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> em fase infectiva	16
4.8.3.3. Processamento dos antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> em fase infectiva	16
4.8.4 Padronização da reação de ELISA com antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> em fase infectiva	17
4.8.4.1 Protocolo técnico da reação de ELISA	18
4.8.5 Avaliação da infectividade da cepa de <i>Leishmania braziliensis</i> após a 55^a passagem em cultura	18
4.8.5.1 Infecção experimental <i>in vitro</i>	19
4.8.5.2 Sensibilidade à lise pelo complemento	19
4.8.5.3 Dosagem de Óxido Nítrico	19
4.8.6 Análises Estatísticas	20
4.8.7 Aspectos Éticos	21
5. RESULTADOS	22
5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	22
5.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS	23
5.2.1 Padronização do ELISA com antígenos obtidos de parasitas em fase infectiva	24
5.2.3 Avaliação da infectividade da amostra de <i>Leishmania braziliensis</i>	27
5.2.3.1 Infecção experimental <i>in vitro</i>	28
5.2.3.2 Sensibilidade à lise pelo complemento	28
5.2.3.3 Dosagem de Óxido Nítrico	28
6. DISCUSSÃO	30

7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
9. ANEXOS	51
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	51
ANEXO B - Termo de Aprovação CEP	58
ANEXO C - Termo de Compromisso e Responsabilidade	60

1. INTRODUÇÃO

AS LEISHMANIOSES: aspectos gerais

As leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, família Tripanosomatidae. São parasitas flagelados, heteroxênicos, que se apresentam sob duas formas principais no seu ciclo evolutivo: promastigotas, que possuem flagelo e vivem no trato digestivo de várias espécies de flebotomíneos e amastigotas, que são formas arredondadas, com flagelo rudimentar não exteriorizado e que se localizam em células fagocitárias dos vertebrados, como o macrófago (ALEXANDER et al. 1975; CHANG et al. 1976; HOMMEL, 1978; BREWSTER; BARKER, 2002).

Os flebotomíneos são insetos hematófagos, da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. Apenas um gênero, *Lutzomyia*, possui importância na transmissão das leishmanioses nas Américas (BASANO; CAMARGO, 2004). Apenas as fêmeas possuem o aparelho bucal adaptado para picar a pele dos vertebrados. Sua contaminação ocorre no momento do repasto sanguíneo quando ingere macrófagos parasitados. Em seu intestino essas células se rompem e liberam as amastigotas, que se diferenciam em promastigotas e se multiplicam na luz do tubo digestivo do inseto vetor. Ao fazer um novo repasto sanguíneo estas formas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado. Pouco se sabe sobre seus criadouros, podendo ser encontrados em fendas de rochas, cavernas, raízes do solo e de folhas mortas e úmidas, solo úmido, detritos orgânicos e em decomposição (REY, 1991; BASANO; CAMARGO, 2004).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) constitui um problema de saúde pública em 88 países. É considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas. É uma doença capaz de produzir deformidades, afetando psicologicamente, socialmente e economicamente o indivíduo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Brasil, as principais espécies envolvidas no ciclo de transmissão desta forma da doença são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcome* e *Lutzomyia migonei*. Sendo que no Rio de Janeiro, as principais espécies encontradas são *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia whitmani* e *Lutzomyia migonei* (Ministério da Saúde, 2007).

Já foram encontrados como hospedeiros e possíveis reservatórios algumas espécies de roedores, marsupiais e canídeos silvestres. A infecção em animais domésticos (cães, gatos, equinos) é comum, porém não há evidências que estes animais atuem como reservatórios, sendo considerados hospedeiros acidentais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A lesão cutânea ulcerada única é a forma mais comum de apresentação da doença. A úlcera é indolor, de tamanho variável, com bordas bem delimitadas, elevadas, fundo granuloso e que sangra facilmente. As lesões se localizam, preferencialmente, em áreas descobertas, como membros inferiores e superiores. Também podem ocorrer lesões múltiplas (entre duas a dez) ou disseminadas, o que é menos comum (OLIVEIRA-NETO, 1998).

As lesões tendem a ser benignas, curando-se espontaneamente (COSTA et al. 1987) ou após tratamento específico (OLIVEIRA-NETO, 1998). Raramente as lesões tomam um curso progressivo, tornando-se graves.

A leishmaniose visceral humana (LV) é uma doença grave, potencialmente fatal caso não seja instituído o tratamento adequado, sendo transmitida, no Brasil, por *Leishmania chagasi* (MAURICIO et al. 2000). Acomete pessoas de todas as idades, sendo que na maior parte das áreas endêmicas 80% dos casos ocorre em crianças menores de dez anos. Nos centros urbanos a ocorrência em jovens adultos vem ganhando importância (SILVA et al. 2001).

Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis é apontada como a principal espécie no ciclo de transmissão de *Leishmania chagasi* no Brasil. Os reservatórios silvestres são constituídos por raposas e marsupiais, enquanto o cão é o principal hospedeiro doméstico, servindo de fonte de infecção para os vetores (GONTIJO; MELO, 2004).

Alguns sinais clínicos da LV são febre prolongada, hepatomegalia, esplenomegalia, tosse, dor abdominal, diarreia, perda de peso e caquexia (GONTIJO; MELO, 2004).

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

No Velho Mundo as espécies encontradas infectando o homem e causando a LTA são *Leishmania tropica*, *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*, consideradas endêmicas na área do Mediterrâneo, Ásia, subcontinente da Índia e África. No Novo Mundo existem pelo menos quatorze espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem sendo endêmica na América do Sul e Central (exceto Chile e Uruguai), onde é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (DESJEUX, 1996; MARZOCHI et al. 1994; GRIMALDI et al.

1989). No Brasil sete espécies podem ser responsáveis pela doença: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia.) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* *Leishmania (Viannia) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

As leishmanioses estão amplamente distribuídas por todo o Brasil, com maior frequência nas regiões Norte e Nordeste. Entre 1985 e 2005 foi verificada uma média anual de 28.568 casos autóctones de LTA no Brasil e em 2003 foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Na região sudeste do Brasil, a LTA é causada principalmente por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, responsável pelas duas principais formas clínicas da doença: cutânea e mucocutânea. A transmissão se dá através da picada do inseto vetor infectado, envolvendo predominantemente reservatórios silvestres. Entretanto, nas últimas décadas, casos de LTA têm ocorrido em áreas não silvestres, peri-urbanas e urbanas, envolvendo reservatórios domésticos (canídeos e eqüinos) e flebotomíneos com hábitos peridomiciliares para a manutenção do ciclo parasitário (DIAS et al. 1977; MAYRINK et al. 1979; CUBA-CUBA et al. 1985; OLIVEIRA- NETO et al. 1988).

Quando o ser humano fixa residência próxima a mata, o flebotomíneo se adapta a esse ambiente e facilita a transmissão do parasita a animais domésticos e seres humanos, não importando a idade, sexo ou atividade profissional. No processo epidemiológico clássico o ciclo é mantido entre flebotomíneos e animais silvestres, sendo o homem um hospedeiro acidental que se infecta quando penetra na mata. Nesta situação a maior parte dos infectados é constituída de homens adultos em idade produtiva, sendo considerada uma doença ocupacional (LAINSON, 1983; TALHARI et al. 1988).

1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico considerado desejável na LTA é realizado através de métodos que têm como objetivo a visualização e/ou isolamento do parasita (GARHAM, 1971; FURTADO, 1980). O método direto mais utilizado consiste na escarificação da borda de lesão visualizando-se formas amastigotas no tecido. É uma técnica rápida e de baixo custo. Porém, nas formas cutâneas e mucocutâneas a escassez de parasitas na lesão justifica a baixa sensibilidade do teste (77% - LOPEZ et al. 1993; 62% - PIRMEZ et al. 1999). Por isso, a utilização de diferentes métodos em conjunto, como o cultivo de parasitas, o *imprint* (de fragmento de borda de lesão)

e a histopatologia, podem contribuir para o diagnóstico. O cultivo de parasitas a partir da biópsia de lesão pode ser feito *in vitro* ou *in vivo*. O cultivo *in vitro* exige meios de cultura adequados, procedimentos de esterilização do material empregado para que não ocorram contaminações por fungos ou bactérias e um tempo de espera do crescimento do parasita para a liberação do resultado (LOPEZ et al. 1993). O cultivo *in vivo* é feito através da inoculação em animais de laboratório susceptíveis, porém exige espaço físico e um infectório apropriado para abrigar esses animais, não sendo mais utilizado com fins diagnósticos.

Nas situações em que a visualização do parasita não é possível, outras ferramentas de diagnóstico são importantes como a intradermorreação de Montenegro (IDRM) e testes sorológicos.

A IDRM, teste de hipersensibilidade tardia, é um método empregado por ter uma sensibilidade de 82,4% (SHAW et al. 1975) a 100% (BARBOSA et al. 1972) tornando-se assim importante para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, especialmente quando causada por *Leishmania braziliensis* (MONTENEGRO, 1926).

Além de ser uma ferramenta muito utilizada, é muito importante no diagnóstico de casos com envolvimento mucocutâneo, no qual se torna frequentemente difícil ou impossível a demonstração do parasita (MARZOCHI et al. 1992; GONTIJO et al. 2003). Porém, quando utilizada sozinha, tem valor limitado e, portanto, quando possível, deve ser empregada em conjunto com outros métodos. Além disso, o teste se torna positivo em torno de quatro meses após o início da lesão cutânea, mas não diferencia doença atual e passada, permanecendo positivo após o tratamento. É, geralmente, negativo na forma cutânea difusa e em imunodeprimidos (MONTENEGRO, 1926).

Em contrapartida, vários testes sorológicos podem ser utilizados para detecção de imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania* em amostras de soro e plasma de indivíduos infectados. Os mais frequentemente utilizados são a reação de imunofluorescência indireta (MAYRINK et al. 1967; SHAW et al. 1964; MARZOCHI et al. 1981; BADARÓ et al. 1983), hemaglutinação indireta (ZUCHERMAN, 1975) e técnicas imunoenzimáticas como ELISA, Dot-ELISA e Imunoblotting (HOMMEL et al. 1976,1978; VOLLER et al. 1976; BADARÓ et al. 1985).

O método mais utilizado é a imunofluorescência indireta. Técnica sensível, mas com a possibilidade de reações cruzada com *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, e *Leishmania chagasi*, responsável pela leishmaniose visceral (KAR, 1995). Este teste apresenta resultados variáveis por refletir a resposta do hospedeiro, seja pela baixa antigenicidade do parasita ou pela baixa quantidade de anticorpos circulantes (MENDONÇA et al. 1988).

O Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), cuja sensibilidade nos testes varia de 65,4% (NASCIMENTO et al. 2003) a 100% (JUNQUEIRA PEDRAS et al. 2003), é utilizado com sucesso por ser um teste rápido, que permite automatização e a utilização de antígenos purificados

O resultado negativo na sorologia não significa ausência de doença e quando a reação é positiva, os níveis de anticorpos tendem a ser baixos, exceto na leishmaniose mucosa e na cutânea difusa (KAR, 1995). É comum um resultado negativo de sorologia em pacientes imunossuprimidos ou com pouco tempo de evolução da doença (até seis meses). Aqueles que são positivos e possuem níveis de anticorpos mais elevados geralmente têm múltiplas lesões, indicando uma maior imunogenicidade relacionada a uma maior exposição antigênica (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Geralmente os níveis de anticorpos diminuem ou desaparecem após a cura, podendo seu monitoramento ser utilizado como controle de cura (MARZOCHI et al. 1980).

Em virtude das dificuldades existentes para o diagnóstico definitivo da LTA através da demonstração do parasita em tecidos ou em cultura (necessidade de pessoal treinado, métodos diagnósticos trabalhosos e longo intervalo de tempo para obtenção dos resultados) outros métodos diagnósticos ganham importância, como as técnicas moleculares (DEGRAVE et al. 1994).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) promove a ampliação do DNA parasitário e tem apresentado uma sensibilidade em torno de 97% para a leishmaniose cutânea e 71% para a leishmaniose mucosa causada por *Leishmania braziliensis* (PIRMEZ et al. 1999). Contudo, deve-se ter cautela ao discutir o seu valor diagnóstico, visto que o DNA parasitário pode ser encontrado em cicatrizes (OLIVEIRA-NETO et al. 1998) e no sangue periférico, podendo ser encontrado muitos anos após a cura ou em indivíduos moradores de área endêmica (COUTINHO et al. 2002).

1.4 IMUNOPATOGÊNESE

A resposta imune do tipo celular é importante na vigência da leishmaniose tegumentar (ALMEIDA et al. 2003). A leishmaniose cutânea e mucosa possuem intensa resposta tipo 1, associada à produção de interleucina (IL-2), interferon (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (SCOTT et al. 1988, 1989). Por ser um parasita intracelular obrigatório, a principal

defesa do organismo é a partir do IFN- γ , que estimula a ativação de macrófagos e a síntese de derivados de O₂ (NO e H₂O₂) tóxicos para a leishmania. Se não modulada a resposta tipo 1 pode ocasionar dano tecidual, enquanto a deficiência da resposta imune protetora está relacionada com a multiplicação do parasita (RIBEIRO-DE-JESUS et al. 1998).

A leishmaniose mucosa desenvolve uma resposta celular exacerbada. Há uma maior atividade de células T específicas, acompanhada de níveis elevados de anticorpos quando comparada à forma cutânea localizada (CARVALHO et al. 1985; COUTINHO et al. 1987). Há uma produção significativa de IL-4 (PIRMEZ et al. 1993) e embora haja produção de IFN- γ , a presença de resposta tipo 2 anularia os efeitos das citocinas tipo 1, podendo explicar o aspecto crônico das formas mucosas. Estes pacientes produzem quantidades elevadas tanto de IFN- γ quanto de IL-4 e IL-5 (CARVALHO et al. 1985; PIRMEZ et al. 1993; DA-CRUZ et al. 2002).

Já a leishmaniose disseminada e cutânea difusa estão associadas a diminuição ou ausência da resposta tipo 1 (BOMFIM et al. 1996; CARVALHO et al. 2005). A resposta tipo 2, caracterizada pela produção de IL-4 e IL-5 está associada a susceptibilidade à infecção e proliferação do parasita (SCOTT et al. 1988, 1989).

FOLLADOR et al. (2002) mostraram que indivíduos residentes em área de transmissão de *Leishmania braziliensis*, com sorologia e IDRMs positivos, são capazes de controlar a infecção quando apresentam resposta imune modulada (tipo 1 e tipo 2), não ocasionando danos.

Na leishmaniose visceral está bem determinado o papel da resposta imune tipo 2, com baixa participação da imunidade celular, baixa produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-2) e grande produção das citocinas IL-4 e IL-5, ativação de células B e hipergamaglobulinemia (GALVÃO-CASTRO et al. 1984; HOLADAY et al. 1993). A presença de anticorpos IgE específicos tem sido associada com a fase ativa da doença (ATTA et al. 1998).

A leishmaniose tegumentar é marcada por uma resposta humoral mediada por baixos níveis de anticorpos séricos, algumas vezes não detectáveis pelos testes empregados. A produção de anticorpos específicos, independente da forma clínica, é predominantemente constituída por IgG (MARZOCHI et al. 1986; LABRADA et al. 1989; GUIMARÃES et al. 1989). Estudos em amostras sorológicas humanas relatam baixas concentrações séricas de imunoglobulina A (IgA) anti-*Leishmania* em pacientes com leishmaniose mucocutânea no início da infecção e níveis moderados de imunoglobulina M (IgM) anti-*Leishmania* nos dois primeiros meses de infecção (LABRADA et al. 1989). Com isso, várias metodologias são aplicadas na tentativa de diagnosticar a LTA em diferentes estágios evolutivos da doença,

assim como a dosagem de subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) correlacionando-os com diferentes perfis clínicos da doença (ULRICH et al. 1995).

SOUZA et al. (2005) mostraram em seu estudo que o perfil de isotipos de imunoglobulinas em pacientes com LTA foi IgG1>IgG3>IgG2>IgG4. No estudo, a IgA foi detectada em níveis altos em pacientes com a forma mucosa (57,5%) e a IgE foi encontrada na maior parte das amostras, porém com baixa reatividade. Dados da literatura indicam que IgG1, IgG2 e IgG3 têm sido associadas a uma resposta tipo 1 (CASTES et al. 1983; CARVALHO et al. 1985), enquanto que a subclasse IgG4 se relaciona com a leishmaniose cutânea difusa (resposta tipo 2). A IgE mostra uma associação com a IDRM. Este anticorpo estaria associado a imunorregulação na leishmaniose cutânea (SOUZA-ATTA et al. 2002).

Alguns componentes antigênicos do parasita são capazes de induzir uma resposta imune diferenciada. Alguns antígenos recombinantes estimulam resposta tipo 1 enquanto outros estimulam uma resposta regulatória. Os antígenos H2A e H3 estimulam a produção de IFN- γ (DE CARVALHO et al. 2003); o LelF induz a produção de IL-2 (SKEIKY et al. 1995, 1998); e o LACK e KPM11 estimulam a secreção de IL-10, que regula negativamente a resposta imune (BOTREL et al. 2001; CARVALHO et al. 2005).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O Centro de Referência em Leishmanioses pertence a uma instituição de pesquisa clínica em doenças infecciosas, no qual são atendidos casos suspeitos de LTA. Estes são submetidos a um protocolo clínico padronizado. Houve uma queda no número de casos suspeitos de LTA atendidos ao longo dos anos no Centro de Referência. Em 2006 esse número era de 130 pacientes, em 2007 houve uma queda para 72 pacientes e em 2008 esse número chegou a 32 pacientes, dos quais aproximadamente 70% são confirmados como novos casos de LTA por cultura. Este projeto insere-se na linha de pesquisa de validação diagnóstica do Laboratório de Epidemiologia Clínica do IPEC / Fiocruz, onde foram realizadas a conceptualização do projeto, randomização das amostras séricas e as análises estatísticas.

As atividades laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Vigilância em Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC / FIOCRUZ) com colaboração do laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC / FIOCRUZ). Os equipamentos utilizados no projeto já existiam nos laboratórios onde o projeto foi desenvolvido.

A associação do quadro clínico do paciente com o perfil de imunoglobulinas é muito complexa na LTA. Estudos anteriores (KAR, 1995; RIBEIRO et al. 2007) mostraram que a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico sorológico depende do tipo, da origem e da pureza do antígeno utilizado.

Com isso, pesquisas procuram identificar e caracterizar moléculas com propriedades imunogênicas que possam ser empregadas com a finalidade de elevar a sensibilidade e a especificidade de testes sorológicos. A busca por antígenos purificados para uso em testes sorológicos demonstrou a existência de moléculas com algum potencial imunogênico, como gp 6 por BOUVIER et al. (1985), GBP por JENSEN et al. (1996), HSP 60 por REY-LADINO et al. (1997) e T26-U2 e T26-U4 por MONTOYA et al. (1997). A sensibilidade dos antígenos variou de 80 a 90%, sendo que T26-U2 e T26-U4 apresentaram valores de sensibilidade semelhantes ao extrato parasitário total, enquanto que GBP foi mais sensível se comparado ao antígeno bruto (67%). Apesar do bom desempenho sorológico destes antígenos, outros testes são necessários para verificar o valor diagnóstico destes, visto que foram testados em soros de pacientes peruanos e colombianos. Além disso, foram utilizados antígenos provenientes de *Leishmania major*, *Leishmania donovani* e *Leishmania peruviana*, sendo que a principal

espécie encontrada no estado do Rio de Janeiro é a *Leishmania braziliensis* (JENSEN et al. 1996; REY-LADINO et al. 1997; MONTOYA et al. 1997; BAPTISTA et al. 2008).

Apesar de apresentarem limitado valor, os testes sorológicos contribuem, significativamente, para o estabelecimento do diagnóstico da LTA, especialmente nos casos em que o diagnóstico parasitológico não é possível (DE LIMA BARROS, 2005).

A reação de imunofluorescência indireta (IFI) é a mais utilizada no diagnóstico sorológico, sendo sensível. Contudo, apresenta possibilidades de reação cruzada e em lesões entre um a seis meses de evolução freqüentemente ocorrem resultados negativos (GONTIJO et al. 2003). A técnica de ELISA é rápida, de fácil execução e leitura, sendo um pouco mais sensível do que a IFI e, assim, o teste permite a detecção de baixos níveis de anticorpos. Entretanto, é pouco preciso nos casos subclínicos ou assintomáticos (EL-AMIN et al. 1986).

O amplo espectro de desordens causados na leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis* sugere uma variabilidade genética entre os parasitas (SCHRIEFER et al 2004). Esta variabilidade está relacionada com os vetores e/ou reservatórios envolvidos no ciclo de transmissão, como o verificado por CUPOLILLO et al. (2003), com cepas de *Leishmania braziliensis* provenientes da Amazônia. Os autores também indicaram que as cepas de *Leishmania braziliensis* que circulam na costa atlântica do Brasil apresentam baixa heterogeneidade, se comparada com as da região amazônica. BAPTISTA et al. (2008) também verificaram em seu estudo que as cepas de *Leishmania braziliensis* que circulam no estado do Rio de Janeiro possuem baixa complexidade, sendo encontrado, na maioria dos isolados estudados, o mesmo genótipo (LbmtDNAGen1). Com isso é mantido um padrão de LTA.

A utilização de antígenos espécie-específicos pode melhorar o diagnóstico sorológico das leishmanioses (GONCHAROV et al. 1989) e antígenos homólogos de *Leishmania braziliensis* resultam em altos títulos de detecção de anticorpos, contribuindo para um diagnóstico mais eficiente da infecção (HAILU, 2002).

Alguns parasitas do gênero *Leishmania* têm em comum epítomos que promovem reação cruzada com outros microorganismos, como *Trypanosoma*, *Plasmodium* e *Mycobacterium*.

Estudos realizados no IPEC, relacionados às cepas não infectivas, comparando extrato total parcialmente solúvel e fração enriquecida com membrana de *Leishmania amazonensis* em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) do estado do Rio de Janeiro, revelou uma sensibilidade de 70% e 84,3% (dados não publicados), respectivamente. Estudos posteriores demonstraram que antígenos parcialmente solúveis de

Leishmania braziliensis, também de cepa não infectiva, apresentaram bons resultados de sensibilidade e especificidade: 95% e 100%, respectivamente (BARROSO-FREITAS et al. 2009).

Convencionou-se na literatura que cepas do gênero de *Leishmania* são consideradas infectivas até a 5.^a passagem em cultura, apresentando altas concentrações de óxido nítrico e dosagem de formas metacíclicas infectantes.

Estando a expressão de antígenos de superfície aumentada em parasitas com capacidade infectiva, quando comparados aos de fase não infectiva, torna-se importante investigar se esta maior expressão estaria associada a uma maior antigenicidade e, conseqüentemente, a um melhor desempenho em testes sorológicos com objetivo diagnóstico (SACKS, 1992). Visto que até o momento apenas foram realizados testes com cepas não infectivas e que um melhor desempenho sorológico foi encontrado para a fração solúvel de *Leishmania braziliensis*, caberia, portanto, investigar o desempenho dos antígenos de membrana da cepa em fase infectiva desta espécie no ensaio imunoenzimático.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho do ensaio imunoenzimático (ELISA) empregando frações solúvel e enriquecida com membrana de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em fase infectiva e não infectiva, para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a confiabilidade dos ensaios imunoenzimáticos com os antígenos empregados.
- Estimar a acurácia do diagnóstico imunoenzimático da LTA frente aos antígenos empregados.
- Verificar a infectividade da cepa de *Leishmania braziliensis* após a 55.^a passagem em cultura.

4. METODOLOGIA

A princípio, o objetivo do estudo era comparar por ensaio imunoenzimático frações solúvel e enriquecida com membrana de uma cepa de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva e não infectiva. Contudo, como veremos no decorrer da dissertação, a amostra após a 55^a passagem em cultura permaneceu infectiva, impossibilitando a avaliação do ensaio imunoenzimático com a amostra em fase não infectiva.

DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo de acurácia diagnóstica de ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir de uma coorte de 400 casos suspeitos em investigação para LTA no ambulatório especializado do Centro de Referência em Leishmanioses do IPEC / Fiocruz, no período de 2005 a 2007.

POPULAÇÃO DE ESTUDO

As amostras estudadas foram constituídas de soros de pacientes que cumpriram todo o protocolo clínico de investigação, que inclui exames de *imprint*, cultura, histopatologia, biópsias, IDRM (anexo A) e que foram randomicamente selecionadas até completar o tamanho amostral calculado. Todos os pacientes adultos que chegaram ao ambulatório do IPEC com suspeita de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) passaram pelo protocolo de investigação, fazendo todos os exames necessários e já no primeiro atendimento assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo A) do projeto de rotina clínica já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e que previa a utilização de suas amostras séricas. Foram revisados os prontuários dos pacientes a fim de se obter dados diagnósticos destes.

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Inclusão: Foram elegíveis os pacientes atendidos do ambulatório do IPEC, utilizando-se a primeira amostra de soro destes pacientes, com diagnóstico confirmado de leishmaniose tegumentar por demonstração do parasita através de *imprint*, cultura ou histopatologia com ou sem caracterização do parasita e que passaram por todo protocolo de investigação. Além disso, todos os participantes do estudo assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

O grupo controle foi constituído de soros de pacientes atendidos no mesmo ambulatório do Centro de Referência, mas nos quais foi descartado o diagnóstico de LTA e confirmado o de outra doença pelo protocolo de investigação.

Exclusão: Pacientes sem diagnóstico confirmado ou protocolo de investigação incompleto.

4.4 TAMANHO AMOSTRAL

Para o Estudo de Confiabilidade: O tamanho amostral para verificação de repetibilidade foi estimado em no mínimo 137 soros devendo ser testados por dois observadores independentes ou em dois momentos distintos, para um Coeficiente de Correlação Intraclasse de 0,95, com um nível de 95% de confiança e um erro absoluto de 0,03. Estas amostras foram selecionadas randomicamente por meio de lista de números aleatórios dentre as analisadas em duplicata.

Para o Estudo de Validação: Considerando uma sensibilidade de 95% no ELISA para o antígeno parcialmente solúvel (BARROSO-FREITAS et al. 2009), uma sensibilidade de 80% para a fração enriquecida com membrana (segundo estudos preliminares do mesmo grupo), ambas com cepas de *Leishmania braziliensis*, em um teste bicaudal, com erro alfa de 0,05 e poder de 80%, o tamanho amostral mínimo necessário calculado para cada grupo foi de 76 pacientes.

4.5 ALEATORIZAÇÃO E MASCARAMENTO

Os soros foram selecionados de forma randomizada, empregando-se o software *Epi_info 6.4*, a partir das 400 amostras séricas disponíveis no período de 2005 a 2007. A seleção foi aleatória simples a partir de uma lista de números aleatórios fornecida por computador. Para cada grupo os soros disponíveis foram previamente numerados seqüencialmente e as técnicas foram realizadas sem que se desvendasse o status diagnóstico de cada amostra utilizada a fim de minimizar a ocorrência de viés de classificação relativo aos resultados de ELISA, mesmo considerando que é uma técnica semi-automatizada.

4.6 CONFIABILIDADE

Foram realizadas duas leituras ópticas de ensaio imunoenzimático, em momentos distintos, pelo mesmo técnico treinado, para cada antígeno utilizado. Nas duas leituras foi garantido o mascaramento do status diagnóstico.

4.8 PROCEDIMENTOS

4.8.1 Coleta da amostra

As amostras séricas utilizadas neste estudo já existiam no laboratório de Vigilância em Leishmanioses, constituindo um banco de soros relacionado a outro projeto de rotina clínica. Não foram realizadas novas coletas. Todas as amostras de soros utilizadas neste projeto estavam diluídas 1:2 em glicerina e estocadas em freezer a -20°C.

4.8.2 Revisão de prontuários

Foram coletados dados relativos aos resultados de *imprint*, histopatologia e cultura de todos os pacientes incluídos. O grupo controle foi constituído de indivíduos com resultados negativos de histopatologia, cultura e *imprint* e os indivíduos com LTA possuíam pelo menos um dos exames com resultado positivo.

4.8.3 Parasitas e antígenos utilizados nos testes

Selecionou-se para este estudo uma amostra de *Leishmania braziliensis* isolada em 6/12/2002 de um paciente do município do Rio de Janeiro que apresentou uma resposta clínica e terapêutica padrão. A amostra foi identificada por eletroforese de isoenzimas, criopreservada em diferentes lotes até a 5.^a passagem em cultura para utilização dos parasitas em fase infectiva e mantida em cultura por repiques semanais para obtenção da mesma amostra de *Leishmania braziliensis* em fase não infectiva (GENESTRA et al. 2004; CYSNE-FINKELSTEIN et al. 1998).

A amostra foi identificada como MHOM/BR/02/R.787 e foram realizadas curvas de crescimento para estabelecimento da fase estacionária do crescimento *in vitro*.

As cepas em fase infectiva (5.^a passagem em cultura) apresentam alta produção de óxido nítrico, cerca de duas a três vezes mais do que as de fase não infectiva (após a 50.^a passagem em cultura) e, além disso, possuem grande quantidade de formas metacíclicas infectantes, cuja quantidade vai diminuindo com o aumento do número de passagens em cultura (CYSNE-FINKELSTEIN et al. 1998; GENESTRA et al. 2006). Por isso, a amostra considerada em fase infectiva foi utilizada na 5.^a passagem em cultura e a de fase não infectiva foi utilizada após a 55.^a passagem, cuja avaliação da infectividade foi realizada por diferentes métodos: infecção experimental *in vitro*, sensibilidade à lise pelo complemento e dosagem de óxido nítrico.

4.8.3.1 Curva de crescimento da amostra em fase infectiva e não infectiva

A curva de crescimento foi realizada em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 200 µg/mL de penicilina, 200 µg/mL de estreptomicina e 1% de urina humana (HOWARD, 1991). A curva foi iniciada com 1×10^6 células semeadas em 1 mL de meio de cultura, em tubos do tipo Falcon com capacidade para 15 mL e submetidos à temperatura de 26-28° C. O crescimento foi estimado em número de células/mL em intervalos de 24 horas. As contagens foram realizadas em triplicatas empregando o Azul de Trypan (0,2% em Phosphate Buffered Saline - PBS) em hemocitômetro de Neubauer. A curva de crescimento foi realizada na 5.^a passagem para a amostra em fase infectiva e na 55.^a passagem para a fase não infectiva.

4.8.3.2 Repique para obtenção dos antígenos de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva

O melhor ponto para obtenção dos parasitas foi determinado pela análise da curva de crescimento. Inicialmente, a partir da cultura de manutenção, foi realizado um repique para cerca de 100 mL de meio líquido. Após aproximadamente três dias, o número de parasitas do cultivo foi quantificado e transferido para garrafas de cultivo de células, contendo meio de Schneider, suplementados com 10% de SFB e 1% urina humana, mantendo o inóculo inicial de 1×10^6 células/mL, e processados no período determinado pela curva de crescimento.

4.8.3.3 Processamento dos antígenos de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva

As culturas foram centrifugadas a 5000 rpm, por 10 minutos, a 4.°C. O sedimento foi ressuspensão em 0,25M de sucrose e 5mM KCl (Tampão KCl/Sacarose). Esse procedimento foi repetido num total de três vezes. O sedimento resultante da última lavagem foi ressuspensão em tampão contendo inibidores de proteases (tampão KCl/Sacarose acrescido de PMSF a 0,01 µM, inibidor de tripsina a 0,2 mg/mL, leupeptina a 0,01% e benzamidina a 1 µM) e

submetido à bomba de cavitação por 1500 psi durante 10 minutos, afim de que houvesse rompimento dos parasitas. Posteriormente, estes foram transferidos para homogenizador de *Douncer*, submetendo-os a uma força mecânica para garantir o seu rompimento. A eficiência do processo foi verificada ao microscópio óptico. Posteriormente, o antígeno foi submetido a 105.000g por 30 minutos em ultracentrifuga Beckman Coulter (série 2583 rotor type 35). O sobrenadante resultante foi denominado de fração solúvel e o *pellet* de fração enriquecida com membrana. O *pellet* resultante da ultracentrifugação foi ressuspenso com tampão KCl/Sacarose contendo Triton X-100 (1%) no volume inicial de 3 mL. Posteriormente, foi realizada uma solubilização em *Vortex* por 30 minutos e uma solubilização em homogenizador de *Douncer* por 4 horas, adicionando-se mais 2 mL da solução com Triton X-100 (1%) para lavagem do *Douncer*. Após essa etapa o material foi analisado em microscópio óptico para verificar se ainda havia presença de grumos e uma última centrifugação a 7000 rpm, por 10 minutos, a 4.°C foi realizada, coletando-se o sobrenadante. O conteúdo protéico dos antígenos foi determinado pelo método de Follin-Lowry (LOWRY et al. 1951) (GENESTRA et al. 2004).

4.8.4 Padronização da reação de ELISA com antígenos de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva

Foi estimada a melhor concentração protéica dos antígenos a serem utilizados na técnica, testando-se várias concentrações destes. Também foram tituladas várias diluições do conjugado (anti-IgG conjugada à peroxidase). A fração solúvel da amostra em fase infectiva teve sua concentração de antígeno definida em 50 µg/mL e titulação do conjugado em 1:50.000. Já a fração enriquecida com membrana da mesma amostra teve sua concentração protéica definida em 100 µg/mL e titulação do conjugado em 1:50.000.

4.8.4.1 Protocolo técnico da reação de ELISA

O teste foi realizado segundo metodologia de VOLLER et al. (1976) com modificações descritas a seguir. As placas foram sensibilizadas com 100 µL dos extratos antigênicos da amostra infectiva de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* em concentrações previamente definidas por titulação de proteína (50 µg/mL para a fração solúvel e 100 µg/mL para a fração enriquecida com membrana) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 e posteriormente incubadas *overnight* (18 horas) a 8°C. Após quatro lavagens com PBS pH 7,2 com 0,05% de Tween 20 (PBS-T), em lavadora automática (Tecan – Columbus Washer®), foi adicionado em cada poço 100µL das amostras de soro diluídas a 1:40 em PBS-Tween mais 1% de leite desnatado (Molico; PBS-TL), incubando-se por 45 minutos a 37°C. Seguindo-se a 4 novas lavagens, foram adicionados 100µL de anti-IgG (Sigma®) conjugada à peroxidase, diluídos em PBS-TL e previamente titulados (1:50.000 para as duas frações antigênicas). Após 45 minutos de incubação a 37°C e quatro novas lavagens foram adicionados 100µL de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (Sigma®). A reação ocorreu durante 30 minutos na ausência de luz e em temperatura ambiente, interrompendo-se a reação por adição a cada poço de 50µL de 2N H₂SO₄. Os valores de Absorbância foram lidos a 450 nm em leitor automático de placas (Tecan - Spectran Classic®). A linha de corte foi definida através da *Receiver Operating Characteristic Curve* (curva ROC) após a realização das reações.

4.8.5 Avaliação da infectividade da cepa de *Leishmania braziliensis* após a 55^a passagem em cultura

A amostra mantida em cultura por repiques semanais foi avaliada quanto à sua infectividade através da infecção em cultura de macrófagos (55^a. passagem), sensibilidade à lise pelo complemento (7^a., 61^a. e 68^a. passagens) e dosagem de óxido nítrico (5^a., 32^a. e 66^a. passagens).

4.8.5.1 Infecção experimental *in vitro*

Camundongos adultos Swiss webster (*outbread*) foram sacrificados em câmara de CO₂ para a coleta de macrófagos. Após a assepsia na região abdominal e com o auxílio de duas pinças do tipo “dente de rato” foi exposto o peritônio, onde foi introduzido cerca de 10 mL de Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) sem soro. Após suave massagem nessa região, esse volume foi aspirado com a mesma seringa, acondicionado em gelo e quantificado para o ajuste de 2×10^6 células/mL. O plaqueamento foi realizado em lâminas para cultura (LabTest-8 compartimentos). A encubação foi feita a 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante duas horas, período suficiente para as células aderirem à lâmina. Após, empregando RPMI pré-aquecido (37°C), as lâminas foram cuidadosamente lavadas, retirando-se as células não aderentes, adicionando em seguida meio RPMI contendo 10% de SFB. Após 24 horas do plaqueamento, foram colocadas em contato com a monocamada de macrófagos, formas promastigotas obtidas de fase estacionária de cultura, lavadas, na concentração de dois a cinco parasitas por macrófago. O processo de interação ocorreu pelo período de duas horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂ e após esse tempo, os parasitas não interiorizados foram retirados por meio de lavagem das laminas utilizando meio RPMI (37°C), adicionando em seguida meio contendo 10% de SFB. A infecção celular foi avaliada em intervalos de três, 24, 48 e 72 horas. Nesses pontos as lâminas foram lavadas cuidadosamente em tampão PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa e examinadas em microscópio ótico.

Esse processo foi realizado com a amostra na 55^a. passagem em cultura.

4.8.5.2 Sensibilidade à lise pelo complemento

A avaliação da sensibilidade à lise pelo sistema complemento foi realizada com a amostra de *Leishmania braziliensis* nas 7^a., 61^a. e 68^o. passagens em cultura, segundo o protocolo de CYSNE-FINKELSTEIN et al. (1998) com algumas modificações: a concentração do complemento utilizada para *Leishmania braziliensis* foi de 2%, a temperatura de incubação foi de 34°C e o tempo de incubação de 45 minutos. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer utilizando-se o corante Azul de Trypan.

4.8.5.3 Dosagem de Óxido Nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi realizada segundo o protocolo de GENESTRA et al. (2006) nas 5^a., 32^a. e 66^a. passagens. Promastigotas foram quantificados em câmara de Neubauer, centrifugados a 1.500 g por 10 minutos e o sobrenadante da cultura foi coletado. O nitrito presente no sobrenadante foi mensurado em espectrofotômetro com adição do reagente Griess para o mesmo volume de parasita. Após 10-15 minutos em temperatura ambiente e sobre o abrigo de luz, a absorbância foi mensurada em 540 nm. A concentração de nitrito foi estimada por comparação com uma curva padrão preparada com Nitrito de Sódio em meio Schneider utilizando-se a média \pm Erro Padrão Médio (EPM) *pMann-Whitney (*Instat Graph Pad*).

4.8.6 Análises estatísticas

Foram estabelecidos *cut-offs* para cada um dos antígenos empregados cujos resultados expressos em densidade óptica foram tratados como variáveis contínuas e analisados utilizando-se gráficos de curva ROC. Esta curva calcula o ponto de corte que maximiza a sensibilidade (probabilidade de que o resultado do teste seja positivo quando a doença está presente) e a especificidade (indica a proporção de pessoas sem a doença e que têm um resultado negativo) do teste. Os desempenhos dos diferentes antígenos foi comparados através de suas áreas sob a curva (AUC) ROC, utilizando-se o *software MedCalc 9.3*, Mariakerke, Belgium

A curva ROC é utilizada para avaliar a capacidade do teste em discriminar os indivíduos doentes dos não doentes e comparar o desempenho diagnóstico de dois ou mais testes diagnósticos. Um teste com discriminação perfeita entre os dois grupos apresentaria uma curva próximo do ângulo superior esquerdo do gráfico com 100% de sensibilidade, 100% de especificidade e área sob a curva igual a um.

Foram realizadas duas aferições para cada ensaio imunoenzimático para o cálculo de repetibilidade. A análise foi realizada utilizando-se o coeficiente de correlação intraclassa (CCI). Este coeficiente oferece uma estimativa da fração de variabilidade de medidas devido a variações entre os observadores. O Valor máximo do CCI é um e o limite inferior é um valor

negativo indeterminado. Valores acima de 0,75 devem ser considerados como excelente e valores maiores do que 0,4 interpretados como evidência de boa confiabilidade (SHROUT; FLEISS, 1979).

Os parâmetros de acurácia (sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo e razões de verossimilhança) foram calculados utilizando-se o *MedCalc 9.3*, Mariakerke, Belgium com respectivos intervalos de 95% de confiança. Estes parâmetros foram expressos em proporções e comparados por meio do teste qui-quadrado, considerando-se valores de $p < 0,05$ como significativos.

4.8.7 Aspectos éticos

A rotina clínica de atendimento dos pacientes, incluindo a obtenção de espécimes clínicos para os estudos e a realização de Teste de Montenegro, foi previamente submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do 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. Os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a realização da rotina clínica e /ou entrada no Programa de Leishmanioses do IPEC (anexo A).

O presente projeto de validação diagnóstica, que utilizou amostras séricas dos pacientes do projeto acima citado, foi submetido ao CEP/IPEC para apreciação, aprovado sob o número 0049.0.009.000-7 (anexo B) e os responsáveis firmaram um Termo de Compromisso e Responsabilidade (anexo C). Não foram realizadas novas coletas de amostras, utilizando-se as já existentes no laboratório. Os pacientes aos quais as amostras pertencem assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto de rotina clínica acima citado que prevê a utilização de suas amostras por um novo projeto, desde que este seja aprovado pelo CEP.

5 RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para o estudo de confiabilidade, a fim de que a repetibilidade pudesse ser avaliada, o tamanho amostral calculado foi de no mínimo 137 soros e para o estudo de validação, o tamanho amostral mínimo calculado foi de 76 soros. Todos os indivíduos incluídos no estudo tiveram seus prontuários verificados para obtenção dos resultados de *imprint*, cultura e histopatologia. Os pacientes de LTA possuíram pelo menos um dos exames positivo, enquanto que o grupo controle teve o diagnóstico de LTA descartado, como todos os resultados negativos.

A maior parte da amostra era de mulheres 85 (55.9%), sendo 34 (44.7%) no grupo LTA e 51 (57.1%) no grupo controle (C) média de 39.1 anos de idade (d p 21.7) LTA e 41.6 (d p 20.2) (C). Residiam no município do Rio de Janeiro 37 (48.7%) LTA e 34 (45.9%) (C) ou em outros municípios do estado do RJ (Regiões serrana e dos Lagos) 30 (39.5%) LTA e 19 (25.7%) (C). Estavam empregados 43 (28,3%) LTA e 27 (32.9%) (C) e 13 (17.2%) LTA e 6 (7.9%) (C) eram estudantes. Eram IDRMs positivos 61/66 (92.4%) pacientes do grupo LTA e 29/56 (51.8%) do grupo controle (C).

A doença que predominou no grupo controle foi a esporotricose, diagnóstico diferencial mais freqüente da LTA, seguida de úlcera de membros inferiores e piodermite. A tabela abaixo (tabela 1) mostra a freqüência do diagnóstico do grupo controle.

Tabela 1. Distribuição de frequência do diagnóstico dos pacientes do grupo controle (N = 76)

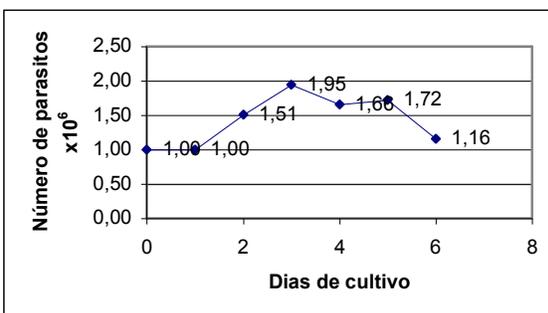
Diagnóstico	N
Esporotricose	22
Úlcera de Membros Inferiores	18
Piodermite	15
Outros	12
Neoplasia	4
Hanseníase	2
Tuberculose	1
Lentigo Solar	1
Tinea	1
Total	76

5.2 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

A amostra de *Leishmania braziliensis* selecionada para o estudo foi mantida em meio de cultura por passagens semanais, sendo considerada em fase infectiva parasitas coletados até a 5.^a passagem e em fase não infectiva parasitas coletados após a 55.^a passagem.

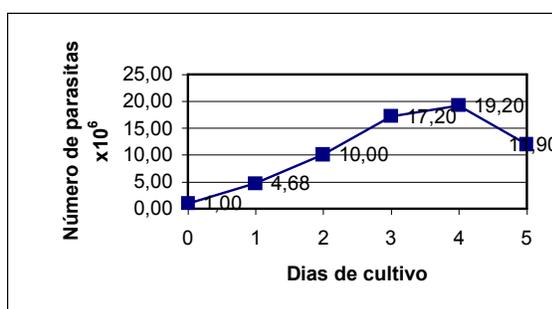
A curva de crescimento para estabelecimento da fase estacionária demonstrou o 4.^o dia como melhor ponto para obtenção dos parasitas em fase infectiva, como demonstrado na figura 1.

Figura 1. Curva de crescimento da cepa de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva



A curva de crescimento da amostra em fase não infectiva foi realizada com parasitas na 55.^a passagem em cultura e, conforme indicado na figura 2, o 3.^o dia foi escolhido como o melhor ponto para obtenção e processamento dos antígenos. Podemos observar também que após a 55.^a passagem em cultura foi encontrada uma maior densidade de parasitas (10^7 parasitas/mL de cultura), se comparado com a curva de crescimento da cepa na 5.^a passagem.

Figura 2. Curva de crescimento da cepa de *Leishmania braziliensis* na 55.^a passagem em cultura



5.2.1 Padronização do ELISA com antígenos obtidos de parasitas em fase infectiva

Os parasitas em fase infectiva foram coletados e processados na 5.^a passagem em cultura. Cerca de 500 mL de cultura foi utilizado. As concentrações protéicas utilizadas para a fração solúvel e fração enriquecida com membrana nos testes de ELISA foram 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente e a titulação do conjugado foi definida em 1:50.000 para as duas frações. A padronização da reação de ELISA definiu o *cut-off* em 0,22 para a fração solúvel e 0,33 para a fração enriquecida com membrana. Ao compararmos o desempenho de uma fração com o de outra percebemos que a diferença entre elas não foi relevante (0,016 dp 0,02), nem estatisticamente significativa ($p = 0,45$). A inspeção da figura 3 revela que ambas as curvas de superpõem. A área sob a curva da fração solúvel foi 0,92 e a da fração enriquecida com membrana 0,93.

Os valores de sensibilidade e especificidade foram satisfatórios para ambas as frações: 89,5 e 89,5 FS; 89,5 e 93,4 para a FM, respectivamente. A fração enriquecida com membrana

apresentou, portanto, uma especificidade ligeiramente maior que a sensibilidade. Este fato pode ser observado nas figuras 4 e 5.

Figura 3. Curvas ROC dos testes ELISA utilizando as frações solúvel (FS) e enriquecida com membrana (FM) da cepa infectiva de *Leishmania braziliensis*

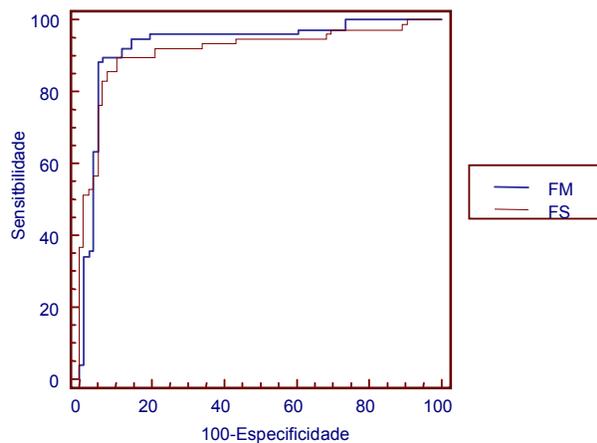


Figura 4. Distribuição dos valores de Densidade Óptica, valor de *cut-off*, sensibilidade e especificidade da fração solúvel da cepa infectiva de *Leishmania braziliensis*

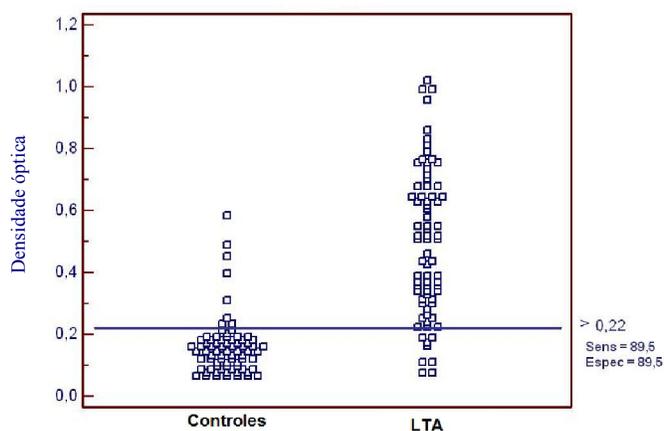
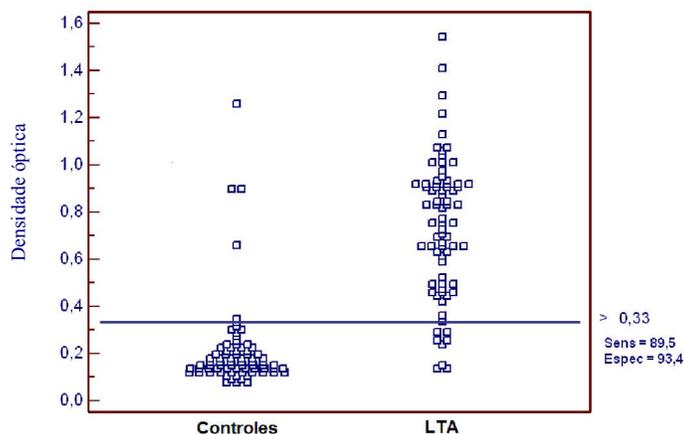


Figura 5. Distribuição dos valores de Densidade Óptica, valor de *cut-off*, sensibilidade e especificidade da fração enriquecida com membrana da cepa infectiva de *Leishmania braziliensis*



Os dados de acurácia e repetibilidade dos testes de ELISA, segundo o tipo de fração utilizado, são apresentados na tabela 2. Observa-se que as AUCs das duas frações foram estatisticamente significativas, na medida em que ambos os testes são muito superiores ao acaso para discriminar verdadeiros doentes de LTA daqueles pacientes por outras causas (os controles). As razões de verossimilhança e os valores preditivos, que são estimativas importantes da acurácia de um teste, possuem, também, valores satisfatórios. Ambos os testes são expressivamente mais positivos entre verdadeiros doentes que entre controles (8,5 FS e 13,6 FM). Considerando a alta prevalência de LTA neste estudo (50%) e a registrada entre os pacientes encaminhados e atendidos no ambulatório de referência do IPEC (70%), os valores preditivos positivo e negativo de um resultado de teste ELISA realizado empregando-se qualquer uma das duas frações foram altos e informativos para a tomada de decisão médica. Os resultados do CCI de 0,96 para a fração solúvel e 0,90 para a fração de membrana permitem considerar excelente a repetibilidade do teste, independente da fração utilizada.

Tabela 2. Dados comparativos de acurácia do ELISA empregando frações solúvel e enriquecida com membrana da cepa infectiva de *Leishmania braziliensis* para Leishmaniose Tegumentar

Parâmetro	Fração Solúvel	Fração Enriquecida com Membrana
Cutoff	0,22	0,33
AUC	0,918 (80,3-95,5)	0,934 (88,2-96,8)
Sensibilidade	89,5 (80,6 - 95,3)	89,5 (80,3-95,3)
Especificidade	89,5 (80,3 - 95,3)	93,4 (85,3-97,8)
Valor Preditivo Positivo	89,5 (81,7 – 94,2)	93,2 (85,8 – 96,9)
Valor Preditivo Negativo	89,5 (81,8 – 94,2)	89,9 (82,4 – 94,4)
Razão de Verossimilhança +	8,5 (4,4 – 16,5)	13,6 (5,8 – 31,8)
Razão de Verossimilhança -	0,12 (0,06 – 0,23)	0,11(0,06 – 0,22)
CCI	0,96 (94,1-96,8)	0,90 (85,9-92,3)

CCI Coeficiente de Correlação Intraclasse
 AUC Area Under the Curve (área sob a curva)

5.2.3 Avaliação da infectividade da amostra de *Leishmania braziliensis*

A proposta deste estudo foi comparar a performance do ensaio imunoenzimático utilizando uma mesma amostra de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva e não infectiva. De acordo com os procedimentos utilizados para esta avaliação, verificamos que a amostra manteve sua infectividade até a 68.^a passagem em cultura, o que inviabilizou a continuidade dos ensaios com as amostra em fase não infectiva.

5.2.3.1 Infecção experimental em *in vitro*

A infecção celular foi avaliada em intervalos de três, 24, 48 e 72 horas.

Após as primeiras três horas foram observadas células espreiadas, parasitas íntegros no interior das células, alguns parasitas não interiorizados e algumas formas semelhantes a amastigotas no interior de macrófagos.

Em 24 horas, foram encontradas células extremamente espreiadas, nenhum parasita externo às células e amastigotas no interior dos macrófagos.

Em 48 e 72 horas, foram observadas células com formas amastigotas em multiplicação e células rompidas com amastigotas não interiorizadas (rompimento devido ao processo de multiplicação das amastigotas no interior do macrófago).

Os resultados acima indicam que a cepa na 55ª passagem ainda estava infectiva.

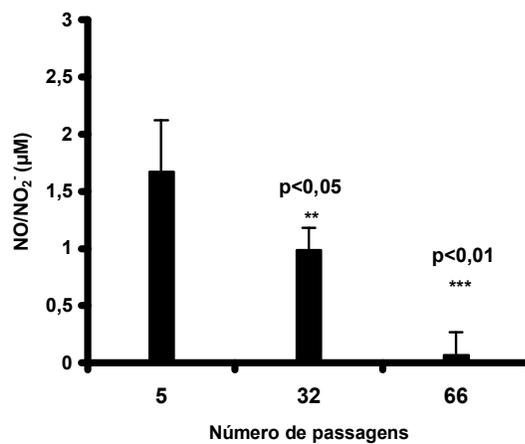
5.2.3.2 Sensibilidade à lise pelo complemento

A amostra foi analisada nas 7ª, 61ª e 68ª passagens em cultura e apresentou 68,7%, 13,3% e 7,5% de formas metacíclicas, respectivamente, no terceiro dia da curva de crescimento (fase estacionária). Estes resultados indicam que a cepa ainda se encontrava infectiva na 68ª passagem.

5.2.3.3 Dosagem de óxido nítrico

Conforme o indicado na figura 6, as concentrações de óxido nítrico diminuem com o aumento do número de passagens em cultura. Quanto menor a quantidade de formas metacíclicas na cultura, menor a produção de óxido nítrico. A diminuição na produção de óxido nítrico indica que a cepa estava perdendo sua infectividade.

Figura 6. Concentração de óxido nítrico/nitrito em sobrenadantes de cultivo de promastigotas de *Leishmania braziliensis* (6×10^6 /mL)



Através dos testes de avaliação da infectividade da cepa, pudemos observar que até a 68^a. passagem em cultura a amostra ainda continuava infectiva, com 7,5% de formas metacíclicas infectantes. Porém, a cepa estava perdendo a sua infectividade e esses dados são demonstrados pela sensibilidade à lise pelo complemento e dosagem de NO.

6. DISCUSSÃO

Dados sorológicos utilizando amostras de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva com frações antigênicas purificadas, ainda são pouco divulgados ou conhecidos e o presente estudo esclareceu um pouco mais o comportamento dessas duas frações empregadas através do ELISA.

Apesar da baixa produção de anticorpos observada nas infecções por *Leishmania braziliensis*, os testes sorológicos têm apresentado valor diagnóstico na LTA, principalmente o ELISA. VIDIGAL et al. (2008), a fim de obter um antígeno mais sensível e específico para o diagnóstico da LTA através do ensaio ELISA, obteve uma fração por cromatografia (fração 8) que apresentou sensibilidade e especificidade de 85,4% e 91,2%, respectivamente. GOMES-SILVA et al. (2008) obteve uma sensibilidade que variou de 60 a 95% entre frações antigênicas obtidas do complexo *Leishmania braziliensis*. Essas frações também foram obtidas por cromatografia (cromatografia de afinidade em coluna de concanavalina-A ligada a sepharose e jacalina ligada a agarose). Os antígenos de *Leishmania braziliensis* apresentaram maior reatividade se comparado ao antígeno total de *Leishmania amazonensis*.

Estudos anteriores realizados no IPEC com cepa em fase não infectiva de *Leishmania amazonensis* apresentaram sensibilidade de 70% para fração parcialmente solúvel e 84,3% para fração enriquecida com membrana em soros de pacientes com LTA. Já testes com cepa não infectiva de *Leishmania braziliensis* utilizando a fração parcialmente solúvel, obtiveram uma excelente sensibilidade de 95% (BARROSO-FREITAS et al. 2009). Isto indica que a espécie constitui um aspecto importante, talvez mais do que a infectividade da cepa. Por esta razão, utilizamos em nosso estudo uma amostra de *Leishmania braziliensis*, visto que tal espécie é a mais prevalente nos casos de LTA no Rio de Janeiro (BAPTISTA et al. 2008).

Anticorpos monoclonais são específicos para algumas espécies de *Leishmania*, entretanto algumas diferenças na reatividade podem ser observadas com espécies de diferentes áreas endêmicas. Essas diferenças podem ser devidas à variação na expressão de certos determinantes antigênicos (GRIMALDI; MCMAHON-PRATT, 1996). Isolados de *Leishmania braziliensis* da Venezuela (BONFANTE GARRIDO et al. 1992) mostraram um perfil diferente quando comparados à mesma espécie que circula no Brasil, Bolívia ou Colômbia (BARRAL et al. 1991; GRIMALDI et al. 1991). O anticorpo monoclonal B16, que identifica *Leishmania braziliensis*, não reage com algumas cepas desta espécie na região amazônica do Brasil e também na Bolívia e Peru (SHAW et al. 1986; GRIMALDI et al. 1991).

Embora neste estudo as duas frações obtidas da cepa infectiva de *Leishmania braziliensis* tenham apresentado boas sensibilidade, especificidade, valores preditivos e razões de verossimilhança, a fração de membrana não alcançou um desempenho superior a fração solúvel. De acordo com a RV+, ambos os testes são expressivamente mais positivos entre verdadeiros doentes que entre controles (8,5 FS e 13,6 FM).

Alguns estudos têm sido realizados buscando-se aprimorar o diagnóstico da LTA e investigaram componentes da superfície da membrana de *Leishmania* sp. na tentativa de obter antígenos mais sensíveis e específicos, sendo a maior parte desses antígenos constituída de glicoproteínas e glicolipídeos (SILVEIRA; KEMMELMEIER, 1995). Foi evidenciado que a adesão de promastigotas e amastigotas às células do hospedeiro depende da presença destas proteínas presentes na membrana (ZENIAN, 1981; STRAUS et al. 1993; HANDMAN, 2000). Estudos com *Leishmania amazonensis* indicam que glicosfingolipídeos são reativos a anticorpos monoclonais e a especificidade dos anticorpos varia de acordo com o tamanho da cadeia de carboidratos. Alguns anticorpos têm afinidade por longas cadeias de carboidratos, 5 ou mais unidade de açúcares (STRAUS et al. 1997).

Segundo SILVEIRA; KEMMELMEIER (1995), o antígeno CHO (antígeno que contém carboidrato) apresenta imunogenicidade e, provavelmente, constitui um antígeno de membrana, sendo liberado no meio de cultura durante o desenvolvimento do parasita. Este antígeno possui polissacarídeos como determinantes antigênicos e foi encontrado na membrana de *Leishmania braziliensis*. Empregando a técnica de contra-imunoelektroforese SILVEIRA; KEMMELMEIER (1995) não observaram reatividade cruzada com pacientes portadores de Chagas e a técnica apresentou uma sensibilidade de 60%.

Reações cruzadas são freqüentes quando se utiliza antígeno total de promastigotas de leishmânias e um antígeno que minimize esse problema vem sendo investigado para o sorodiagnóstico da leishmaniose. É comum no diagnóstico da leishmaniose haver reações cruzadas entre diferentes espécies dentro da mesma família (BRANDÃO-FILHO et al. 1994; MALCHIODI et al. 1994) e entre organismos filogeneticamente distantes como *Mycobacterium* (REED et al. 1987; SMRKOVSKI; LARSON, 1977). CELESTE et al. (2004) compararam técnicas de ELISA utilizando antígeno recombinante de *Leishmania infantum* (Hsp 83) com antígeno total de *Leishmania major* para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Todos os pacientes apresentaram anticorpos contra o antígeno Hsp 83. Este antígeno não apresentou reação cruzada em amostras de pacientes com doença de Chagas enquanto que o antígeno total *Leishmania major* sim.

YONEYAMA et al. (2007) avaliaram a performance do ELISA para o diagnóstico da LTA através da detecção de IgG anti leishmania, utilizando promastigotas de *Leishmania braziliensis*. O teste obteve uma sensibilidade de 93%, enquanto que sua especificidade foi de 70%, devido a reações cruzadas com doença de chagas, toxoplasmose e paracoccidiodomicose.

No estudo realizado por BRITO et al. (2000), antígenos solúveis e insolúveis de *Leishmania braziliensis* foram testados por ELISA, IFI e Western blot. Os testes apresentaram sensibilidade de 62%, 52% e 91% e especificidade de 71%, 79% e 100%, respectivamente. Os testes de ELISA e IFI apresentaram reação cruzada com todos os soros obtidos de pacientes com doença de chagas e LV.

Este estudo de validação seguiu o preconizado no guideline STARD (BOSSUYT et al. 2003) sendo a amostra total de casos e controles selecionada randomicamente de uma coorte de indivíduos, que buscaram investigação diagnóstica para LTA e que cumpriram o mesmo protocolo clínico. Objetivou-se validade interna, isto é, que a acurácia diagnóstica do teste fosse a necessária para discriminar os pacientes que buscam ajuda na vida real deste ambulatório, assim o grupo controle não incluiu artificialmente portadores de doença de chagas, toxoplasmose e LV humana porque não configuram diagnósticos diferenciais neste contexto, embora apresentem reação cruzada. Espera-se potencialmente que este estudo possa ser generalizado para qualquer ambulatório com perfil semelhante. Ainda assim, como esperado, o teste não é perfeito e foram observadas reações cruzadas com diagnósticos diferenciais que compuseram o grupo controle: sete amostras de soros apresentaram reações cruzadas quando foi utilizada a fração solúvel (três em pacientes com úlcera de membros inferiores, um com esporotricose, um com neoplasia e dois com outros diagnósticos) enquanto que para a fração enriquecida com membrana cinco soros apresentaram reação cruzada (dois para pacientes com úlcera de membros inferiores, dois para piodermite e um para esporotricose).

SILVEIRA et al. (2001) mostraram que anticorpos monoclonais, caracterizados como glicoproteínas, foram específicos para *Leishmania braziliensis*. O anticorpo monoclonal SST-2 foi específico para *Leishmania braziliensis*, não reagindo com outras espécies. Em ensaios *in vitro* este anticorpo reconheceu epítomos na superfície do parasita, porém não promoveu diminuição na sua capacidade de infectar macrófagos. O anticorpo SST-3 foi específico para antígenos presentes no flagelo de *Leishmania braziliensis* e também não apresentou reatividade cruzada com outras espécies. A utilização deste anticorpo proporcionou a

diminuição de 50% da infectividade do parasita. Já o anticorpo SST-4 reconheceu proteínas de *Leishmania braziliensis*, porém apresentou reação cruzada com *Leishmania panamensis* por western blotting. Entretanto o anticorpo não foi detectado na superfície do parasita por imunofluorescência indireta e inibiu em 40% a infectividade do parasita.

Esses estudos demonstram que a expressão antigênica pode variar de acordo com a espécie do parasita, interferindo na sua capacidade infectiva.

CAMPOS et al. (2008) analisaram várias espécies do subgênero *Viannia in vitro* e concluíram que *Leishmania braziliensis* apresenta alta infectividade. Isolados obtidos de pacientes com leishmaniose mucocutânea foram mais virulentos que aqueles obtidos de pacientes com leishmaniose cutânea. Além disso, mostraram que há uma correlação inversa entre a infecção de macrófagos e sua produção de óxido nítrico (NO). Cepas com alta virulência, como *Leishmania braziliensis* provenientes de paciente com a forma mucosa (infecção de cinco parasitas / célula), estavam na presença de baixos níveis de NO. Ao contrário de *Leishmania naiffi* que apresentou infecção de três parasitas / célula na presença de grande quantidade de NO. Isto mostra que a cepa de *Leishmania braziliensis* foi capaz de modular a ação antileishmanicida dos macrófagos, resultando numa diminuição da produção de óxido nítrico desta célula e no aumento da sua infectividade.

GIUDICE et al. (2007) concluíram em estudos *in vitro* que *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* são resistentes à destruição pelo NO produzido pelos macrófagos. Segundo os autores, 73% dos isolados de *Leishmania amazonensis* e 18% de *Leishmania braziliensis* foram resistentes. Isso se deve às variações dentro das espécies, como é observado, principalmente, em amostras de *Leishmania braziliensis* que apresentam polimorfismo genético em diferentes regiões brasileiras (CUPOLILLO et al. 2003).

A reatividade de anticorpos monoclonais não mostra variação com o tempo de cultura, meio de cultura ou virulência do parasita (GRIMALDI et al. 1987), porém a variação da sensibilidade dos testes pode ocorrer de acordo com o método utilizado (IFI, ELISA, RIA - radioimunoensaio indireto). Epítomos reconhecidos pelo anticorpo monoclonal D2, específico para *Leishmania donovani*, são reconhecidos por RIA ou ELISA, enquanto são fracamente reconhecidos por IFI (JAFFE et al. 1984; GRIMALDI et al. 1981).

Neste estudo, a cepa de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva demonstrou resultados semelhantes aos já encontrados, em outros estudos (BARROSO-FREITAS et al. 2009) para a cepa em fase não infectiva da mesma espécie. BARROSO-FREITAS et al. (2009),

empregando a técnica de IFI com antígenos de *Leishmania braziliensis* obtiveram sensibilidade e especificidade em torno de 81,5 e 86,2, respectivamente. Os resultados deste estudo indicam que os valores de sensibilidade e especificidade foram maiores nas duas frações antigênicas utilizadas, sugerindo que o ELISA poderia dar uma maior contribuição no diagnóstico da LTA.

Contudo, não há evidências que suportem o uso de um método de execução mais trabalhosa e mais dispendioso, como o que utiliza fração enriquecida com membrana, visto que a diferença de sensibilidade e especificidade entre as duas frações não foi estatisticamente significativa ($p = 0,45$).

Com relação à avaliação da infectividade da cepa de *Leishmania braziliensis*, pudemos observar que até a 68^a passagem a amostra ainda continuava infectiva, demonstrado pelo percentual de formas metacíclicas encontrado. Porém, a dosagem de NO realizada na 66^a passagem e a avaliação da presença de formas metacíclicas na 68^a indicaram que a amostra estava perdendo gradativamente a infectividade, visto que a produção de óxido nítrico por *Leishmania braziliensis* e a presença de formas metacíclicas nestas passagens são muito baixas.

O óxido nítrico é um mediador da atividade microbicida dos macrófagos. É biosintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e atua como importante agente fisiológico em várias funções biológicas, como citotoxicidade, mecanismos hemostáticos, entre outros. Seu ciclo de vida é curto, pois é convertido em nitrito e nitrato na presença de moléculas de oxigênio. Contudo, a dosagem de nitrito e nitrato indica a produção de óxido nítrico (MONCADA; HIGGS, 1995).

Alguns estudos anteriores (GENESTRA et al. 2003, 2006) mostraram que formas promastigotas de algumas espécies de *Leishmania* sintetizam óxido nítrico, indicando sua correlação com a quantidade de formas metacíclicas. O óxido nítrico está envolvido no processo de interação entre parasita e hospedeiro e sua quantidade é maior nas amostras em fase infectiva (GENESTRA et al. 2006). Alguns estudos também realizados com *Trypanosoma cruzi* indicam que o óxido nítrico está relacionado com a estimulação da motilidade da célula e participa na modulação da apoptose do parasita (PAVETO et al. 1995).

Convencionou-se na literatura que parasitas do gênero *Leishmania* são considerados infectivos até a 5.^a passagem em cultura, onde apresentam alta produção de óxido nítrico (GENESTRA et al. 2006). GENESTRA et al. (2003) mostraram que *Leishmania braziliensis* e

Leishmania chagasi também produzem óxido nítrico e mostraram a sua associação com a metaciclologênese, indicando também que o crescimento do número de passagens do parasita é inversamente proporcional a produção de NO, sendo este um indicador de infectividade.

As dosagens de NO obtidas com amostra de *Leishmania braziliensis* em nosso estudo corroboram os resultados encontrados por GENESTRA et al. (2003), indicando a diminuição do nível NO de acordo com o aumento do número de passagens em cultura.

Adicionalmente estudos relacionados à infectividade da cepa de *Leishmania amazonensis* relatam que quanto maior for o número de passagens em cultura, menor é o número de formas metacíclicas, que na amostra em fase infectiva possui valor em torno de 73% (GENESTRA et al. 2003). No estudo realizado por CYSNE-FINKELSTEIN et al. (1998), não foram encontradas formas metacíclicas em amostras de *Leishmania amazonensis* com mais de 30 passagens em cultura.

O percentual de formas metacíclicas encontrado na cultura de *Leishmania braziliensis* analisada neste estudo (68,7% na 7^a. passagem, 13,3% na 61^a. e 7,5% na 68^a) justifica também a infecção em cultura de macrófagos, já que essas formas consideradas infectantes são fagocitadas por estas células e nelas se diferenciam em amastigotas, onde se multiplicam. Os resultados da infecção experimental *in vitro* mostraram que os macrófagos foram infectados pelos parasitas e rompidos, devido à multiplicação das amastigotas em seu interior. A infectividade da amostra de *Leishmania braziliensis* após 55 passagens em cultura, demonstrada neste estudo, constitui um dado novo na literatura.

7. CONCLUSÕES

- 1) Os testes de ELISA, utilizando ambas as frações antigênicas (solúvel e enriquecida com membrana) apresentaram excelente repetibilidade para o diagnóstico da LTA.
- 2) As duas frações obtidas com a cepa de *Leishmania braziliensis* em fase infectiva apresentam sensibilidade e especificidade satisfatórias para o diagnóstico da LTA através do teste de ELISA.
- 3) Embora a expressão antigênica seja maior em amostras infectivas, o comportamento dos testes de ELISA com *Leishmania braziliensis* não foi melhor quando comparado aos descritos na literatura utilizando cepas não infectivas da mesma espécie.
- 4) Após 68 passagens em cultura, a amostra de *Leishmania braziliensis* apresentou sinais de infectividade *in vitro*, o que constitui um dado novo na literatura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander J, Vickerman K. Fusion of cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* infected macrophages. J Protozool 1975; 22: 502-508.
- Almeida MC de, Vilhena V, Barral A, Barral-Neto M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A Review. Mem Ist Oswaldo Cruz 2003 oct; 98 (7): 861-870.
- Atta AMJr, D'Oliveira A, Correa J, Atta MLB, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1998; 59: 426-430.
- Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in american visceral leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two *Leishmania* species. Am J Trop Med Hyg 1983; 32: 480-484.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS et al. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. Exp Parasitol (2008), doi:10.1016/j.exppara.2008.12.006.
- Barbosa W, Souza MC. Investigação sobre imunologia da leishmaniose tegumentar. Ver Patol Trop. 1972; 3 (1): 377-383.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 536-546.
- Barroso-Freitas APT, Passos SRL, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GPL et al. Accuracy of an enzyme immunoassay (ELISA) and indirect immunofluorescence for

- the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 383-389.
- Basano SA, Camargo LMA. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7 (3): 328-337.
- Bonfante-Garrido R, Melendez E, Barroeta S, Mejia de Alejos MA, Momen H, Cupolillo E, Grimaldi Jr G. Cutaneous leishmaniasis in Western Venezuela caused by infection with *Leishmania venezuelensis* and *L. braziliensis* variants. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86:141-148.
- Bonfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol* 1996; 84: 188-194.
- Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE et al. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clin Chem* 2003; 49: 7-18.
- Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 2001; 69: 3232-3239.
- Bouvier J, Etges RJ, Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *leishmania* promastigotes. *J Biol Chem* 1985; 268: 15504-15509.
- Brandão-Filho SP, Carvalho FG, Brito MEF, Almeida FA, Nascimento LA. American cutaneous leishmaniasis in Pernambuco, Brazil: eco-epidemiological aspect in “Zona da Mata” region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 445-449.
- Brewster S, Barker DC. Analysis of minicircles classes in *Leishmania* (*Viannia*) species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 (Suppl. 1): S55-S63

- Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7: 318-321.
- Campos MB, Gomes CMC, Souza AAA, Lainson R, Corbett CEP, Silveira FT. In vitro infectivity of species of *Leishmania* (*Viannia*) responsible for american cutaneous leishmaniasis. Parasitol Res 2008; 103: 771-776.
- Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S et al. Cell Mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. J Immunol 1985; 135: 4144-4148.
- Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ et al. A. Effect of LACK and KPM11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. Scand J Immunol 2005; 61: 337-342.
- Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondon AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. Clin Immunol Immunopathol 1983; 27: 176-186.
- Celeste BJ, Angel SO, Castro LGM, Gidlund M, Goto H. *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of tegumentary leishmaniasis. Braz J Med Biol Res 2004 apr; 37: 1591-93.
- Chang KP, Dwyer DM. Multiplication of a human parasite (*L. Donovanii*) in phagolisosomes of hamster macrophages “in vitro”. Science 1976; 193: 678-679.
- Costa JML, Netto EM, Vale KC, Osaki NK, Tada MS, Marsden PD. Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis* ulcers. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81:606.
- Coutinho SG, Pirmez C, Mendonça SC, Conceição-Silva F, Dorea RCC. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 1987; 82:214-228.
- Coutinho SG, Pirmez C, Da Cruz AM. Parasitological and immunological followup of American tegumentary leishmaniasis patients. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 173-178.

- Cuba-Cuba CA, Miles MA, Vexenat A, Barker DC, McMahon-Pratt D, Butcher J et al. A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços Bahia, Brasil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 500-507.
- Cupolillo E, Brahin LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3126-3132.
- Cysne-Finkelstein L, Temporal RM, Alves FA, Leon LL. *Leishmania amazonensis*: long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. *Exp Parasitol* 1998; 89: 58-62.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattod M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V et al. T-Cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 251-256.
- De Carvalho LP, Soto M, Jeronimo S, Dondji B, Bacellar O, Luz V et al. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes Infect* 2003; 5: 7-12.
- De Lima Barros MB, Schubach AO, Schubach TMP, Valle AC, Francesconi-Do-Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Acta Trop* 2005; 93 (1): 41-7.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 463-469.
- Desjeux P. Leishmaniasis, Public Health Aspects and Control. *Clin Dermatol* 1996; 14: 417-423.

- Dias M, Mayrink W, Deane LM, Costa CA, Magalhães PA, Melo MN et al. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana I. Estudo de reservatórios em áreas endêmicas no estado de Minas Gerais. *Ver St Med Trop* 1977; 19: 403-410.
- El-Amin ER, Wright EP, Abdel Rahman AM, Kolka A, Laarman JJ, Pondaman KW. Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect hemagglutination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 217-214.
- Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infec Dis* 2002; 34: 54-58.
- Furtado T. Critérios para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar americana. *An Bras Dermatol* 1980, 55: 81-86.
- Galvão-Castro B, Sá Ferreira JA, Marzochi KF, Marzochi MC, Coutinho SG, Lambert PH. Polyclonal B cell activation, circulating immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1984; 56: 580-66.
- Garham PC. American Leishmaniasis. *Bul OMS* 1971; 44:521-7.
- Genestra M, De Souza WJS, Cysne-Finkelstein L, Leon LL. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. *Med Microbiol Immunol* 2003; 192: 217-223.
- Genestra M, Finkelstein-Cysne L, Leon L. Protein Kinase A activity is associated with metacyclogenesis in *Leishmania amazonensis*. *Cell Biochem Funct* 2004; 22:315-320.
- Genestra M, Souza JSW, Guedes-Silva D, Machado GMC, Cysne-Finkelstein L, Bezerra RJS et al. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. *Arch Microbiol* 2006 mar; 185: 348-54.
- Giudice A, Camada I, Leopoldo TG, Pereira JMB, Riley LW, Wilson ME et al. Resistance of

- Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in tegumentary leishmaniasis. BMC Inf Dis 2007; 7: 1-12.
- Gomes-Silva A, Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E et al. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. Rev Soc Bras Med Trop 2008 mar; 41(2): 135-41.
- Goncharov DB, Gracheva LI, Saf'ianova VM, Dobrzhanshaia RS, Khuseiinova KHKH. Immunoenzyme analysis with corpuscular antigen in the study of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Med Parasitol 1989; 6: 31-35.
- Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. Rev Soc Bras Med Trop 2003 jan-fev; 36 (1): 71-80.
- Gontijo CMF, Melo MN. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. Rev Bras Epidemiol 2004; 7 (3): 338-349.
- Grimaldi Jr G, David JR, McMahon-Pratt D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am J Trop Med Hyg 1987; 36: 270-287.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A Review of the Geografic and Epidemiology of Leishmaniasis in the New Word. Am J Trop Med Hyg 1989; 41: 687-725.
- Grimaldi Jr G, Momen H, Naiff R, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sandflies in the Amazon Region of Brazil. Am J Trop Med Hyg 1991; 44: 645-661.
- Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D. Monoclonal Antibodies for the Identification of New World *Leishmania* Species. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996; 91 (1): 37-42.
- Guimarães MCS, Celeste BJ, Franco EF, Cucé LC, Belda Jr, W. Evaluations of serological

- diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence testes and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. Bull WHO 1989; 67 (6): 643-648.
- Hailu A. The use of direct agglutination test (DAT) in serological diagnosis of Ethiopian cutaneous leishmaniasis. Diag Microbiol Infec Dis 2002; 42: 251-256.
- Handman E. Cell biology of *Leishmania*. Adv Parasitol 2000; 44: 1-39.
- Holaday BJ, Pompem ML, Geronimo S, Teixeira MJ, Souza AQ, Vasconcelos AW et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with Kalar-azar. J Clin Invest 1993; 92: 2626-2632.
- Hommel M. Enzymoimmunoassay in leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1976; 70: 15-16.
- Hommel H. The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects. Bull Institut Pasteur 1978; 75: 5-102.
- Howard MK, Pharoah MM, Ashall F, Miles MA. Human Urine stimulates growth of *Leishmania in vitro*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1991; 85: 477-479.
- Jaffe CL, Bennett E, Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D. Production and characterization of species specific monoclonal antibodies against *Leishmania donovani* for immunodiagnosis. J Immunol 1984; 133: 440-447.
- Jensen ATR, Gaafar A, Ismail A, Christenser CBV, Kemp M, El Hassan AM et al. Serodiagnosis of cutaneous leishmaniasis: assessment of an enzyme-linked immunosorbent assay using a peptide sequence from gene B protein. Am J Trop Med Hyg 1996; 55(5): 490-495.
- Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro VM, Rabello A. Antibodies subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of

- mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Dis* 2003; 47: 477-85.
- Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit Rev Microbiol* 1995; 21:123-152.
- Labrada M, Weigle K, Valderrama L, Saravia NG. Evaluation of immunoglobulin isotype specific to *Leishmania* in tegumentary American leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989; 84: 409-416.
- Laison R. The American leishmaniasis some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:569-596.
- Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49 (3): 348-356.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Malchiodi EL, Chiamonte MG, Taranto NJ, Zwirnwe NW, Margini RA. Cross-reactivity studies and differential serodiagnosis of human infections caused by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.*, use of immunoblotting and ELISA with a purified antigen (Ag 163 B6). *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 417-423.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza WJS. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepaguá, RJ. Estudo comparativo dos resultados observados em 1974-1978. *Ver Inst Med Trop São Paulo* 1980; 22: 149-155.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WTS, Amendoeira MMR. Leishmaniose visceral - Calazar. *J Bras Med* 1981; 41(5): 61-84.
- Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WTS, Toledo LM, Grimaldi G, Momen H et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brasil. Clinical, Parasitological, therapeutic and

- epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz 1986; 80: 349.
- Marzochi MCA. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. J Bras Med 1992; 63: 82-104.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their conytrol. Cad Saúde Pública 1994; 10: 359-375.
- Mauricio IL, Stohard JR, Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today 2000; 16: 188-9.
- Mayrink W, Araújo FG, Magalhães PA. Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. I sensivity of the test. Ver Inst Med Trop S Paulo 1967; 9: 192-197.
- Mayrink W, Williams P, Coelho MV, Dias M, Martins AV, Magalhães PA et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. Ann Trop Med Parasitol 1979; 73: 123-137.
- Mendonça SC, Souza WJ, Nunes MP, Marzochi MC, Coutinho SG. Indirect immunofluorescence test in New World leishmaniasis: serological and clinical relationship. Mem Inst Oswaldo Cruz 1988; 83: 347-355.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, DF; 2007.
- Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. FASEB J 1995; 9: 1319-1330.
- Montenegro J. Cutaneous reactions in leishmaniasis. Arch Derm Syphilol 1926; 13: 187.

- Montoya Y, Leon C, Talledo M, Nolasco O, Padilla C, Munoz-Najar U et al. Recombinant antigens for specific and sensitive serodiagnosis of Latin American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997 nov-dec; 91(6): 674-6.
- Nascimento LD, Mouta-Confort E, Schubach AO, Madeira MF, Barros MBL, Duarte R, Freitas APTB, Azevedo-Pereira RL, Marzochi MCA. Análise retrospectiva de ELISA com antígenos de *L. major* e *L. braziliensis* em soros de pacientes com leishmaniose tegumentar americana (LTA) do estado do Rio de Janeiro. XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia; 2003 Ago 26-29; Hotel Glória, Rio de Janeiro. Brasil. p. 58.
- Oliveira- Neto MP, Pirmez C, Rangel E, Schubach A, Grimaldi Jr G. Outbreak of american cutaneous leishmaniasis (*L. braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brasil: clinical and epidemiological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988; 83: 427-435.
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Souza CSF, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 37: 846-849.
- Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montagna AE, Farber M, Esteva M et al. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1995; 270: 1-4.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Oliveira-Neto MP, Conceição-Silva F, Modiln RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 1993; 91: 1390-1395.
- Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M et al. Use of the polymerase chain in the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (6): 1819-1823.
- Reed SG, Badaro R, Lloyd RM. Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* by human infection sera. *J Immunol* 1987; 138: 1596-1601.
- Rey L. Parasitologia. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991.

- Rey-Ladino JA, Joshi PB, Singh B, Gupta R, Reiner NE. *Leishmania major*: molecular cloning, sequencing, and expression of the heat shock protein 60 gene reveals unique carboxy terminal peptide sequences. *Exp Parasitol* 1997 mar; 85 (3): 249-63.
- Ribeiro FC, Schubach AO, Confort EM, Schubach TMP, Madeira MF, Marzochi MCA. Use of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis in dogs. *Vet Parasitol* 2007; 148: 200-206.
- Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31: 143-148.
- Sacks DL. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infect Agents Dis* 1992 aug; 1 (4): 200-6.
- Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, Almeida RP et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infec Immun* 2004; 72: 508-514.
- Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med* 1988; 168: 1675-1684.
- Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol Rev* 1989; 112: 161-182.
- Shaw JJ, Voller A. The detection of circulating antibody to Kala-azar by means of immunofluorescence techniques. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964; 58: 342-352.

- Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1975; 69: 323-335.
- Shaw JJ, Lainson R, McMahon-Pratt D, David JR. Seroderms of *Leishmania braziliensis braziliensis* and *Leishmania braziliensis guyanensis*. In *Leishmania*. Taxonomie et Phylogenese. Applications eco-epidemiologiques (Coll Intern CNRS/INSERM, 1984). IMEEE, Montpellier, France; 1986, p. 179-183.
- Shrout PE, Fleiss JL. Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol. Bull.* 1979; 86: 420-428.
- Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Fiuza VOP, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 3: 285-91.
- Silveira TGV, Kimmelmeier C. *Leishmania braziliensis*: isolation of carbohydrate-containing antigen and possibility of its use in the immunodiagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop* 1995 jun; 37 (3): 245-252.
- Silveira TGV, Suzuki E, Takahashi HK, Straus AH. Inhibition of macrophage invasion by monoclonal antibodies specific to *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes and characterisation of their antigens. *Internat J Parasitol* 2001; 31: 1451-1458.
- Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacellar O, Carvalho EM, Kubin M et al. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 1995; 181: 1527-1537.
- Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler Jk et al. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12 mediated Th1 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 161: 6171-6179.
- Smrkovski LL, Larson CL. Antigenic cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* (BCG)

- and *Leishmania donovani*. Infect Immun 1977; 18: 561-562.
- Souza-Atta MLB, Salomé GS, D'Oliveira Jr A, Almeida RP, Atta AM, Carvalho EM. Immunoglobulin E antileishmanial antibody response in cutaneous leishmaniasis. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9: 101-104.
- Souza MA, Gomes-Silva A, Afonso-Cardoso SR, Favoreto Junior S, Ferreira MS. Perfil de isotipos de imunoglobulinas e subclasses de IgG na leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38 (2): 137-141.
- Straus AH, Lavery SB, Jasiulionis MG, Salyan MEK, Steele SJ, Travassos LR et al. Stage-specific glycosphingolipids from amastigote forms *Leishmania (L.) amazonensis*. J Biol Chem 1993; 268: 13723-30.
- Straus AH, Valero VB, Takizawa CM, Lavery SB, Toledo MS, Suzuki E et al. Glycosphingolipid antigens from *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotes. Binding of anti-glycosphingolipid monoclonal antibodies in vitro and in vivo. Braz J Biol Res 1997 jan; 30 (3): 395-99.
- Talhari S, Arias J, Cunha MGS, Naiff R, Freitas R, Barret T. Leishmaniose no estado do Amazonas. Aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. An Bras Dermatol 1988; 63: 433-438.
- Ulrich M, Rodriguez V, Centeno M, Convit J. Differing antibody IgG isotypes in the polar forms of leprosy and cutaneous leishmaniasis characterized by antigen-specific T cell energy. Clin Exp Immunol 1995; 100: 54-8.
- Vidigal CP, Marcussi VM, Marcussi LM, Mikcha JMG, Arraes SMAA, Lonardon MVC et al. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. Acta Trop 2008; 107: 208-212.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasite diseases. Trans R Soc Bras Med Hyg 1976; 70: 98-106.

Yoneyama KAG, Peder Dde, Lonardoni MVC, Silveira TGV. Diagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis by Enzyme Immunoassay in Patients from Northern Paraná States, Brazil. *Braz J Infec Dis* 2007; 11 (3): 360-364.

Zenian A. *Leishmania tropica*: biochemical aspects of promastigote attachment to macrophages in vitro. *Exp Parasitol* 1981; 51: 175-87.

Zuckerman A. Current status of the immunology of blood and tissue Protozoa. I. *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1975 dec; 38 (3): 370-400.

Anexo A - 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) 598-4260 / 598-4263 / 598-4266 / 290-1943 FAX (0xx21) 590-9988

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 antialérgicos. 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.

Os 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 ¹ :	_____ Data
_____ Nome testemunha ¹ :	_____ Data

¹ 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.

¹ 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 B – Termo de Aprovação CEP

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO - 055/2007

Protocolo 0049.0.009.000-07

1. Identificação:

Título do Projeto: "Avaliação do ensaio imunoenzimático (ELISA) de frações solúvel e enriquecida com membrana de cepas infectivas e não infectivas de *Leishmania Viannia braziliensis*".

Pesquisador Responsável: Sonia Regina Lambert Passos. **Mestranda:** Jamyra Iglesias Silva.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 20/08/2007.

2. Sumário:

Este estudo visa a avaliar a acurácia e a confiabilidade do ensaio imunoenzimático (ELISA) com frações solúvel e enriquecida com membrana de cepas infectivas e não infectivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* para o diagnóstico da LTA. A acurácia dos testes sorológicos pode variar em função da espécie de parasita infectante e do antígeno empregado. Método: Estudo de acurácia diagnóstica de ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir de uma coorte de 400 suspeitos que busca confirmação diagnóstica de LTA em ambulatório especializado no período de 2005 a 2007. É de interesse a primeira amostra de soro dos pacientes, com diagnóstico confirmado de leishmaniose tegumentar por demonstração do parasita através de *imprint*, cultura ou histopatologia e dos controles nos quais foi descartado o diagnóstico de LTA. Serão utilizadas 76 amostras de soro de pacientes de LTA e 76 amostras de controles para cada antígeno empregado. Para o estudo de confiabilidade serão realizadas duas aferições de 137 amostras em momentos distintos e pelo mesmo técnico com mascaramento do status diagnóstico.

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

Projeto com delineamento adequado. A rotina clínica de atendimento dos pacientes, incluindo a obtenção de espécimes clínicos para os estudos e a realização de Teste de Montenegro, foi previamente submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC, constituindo o projeto: "Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA IPEC/FIOCRUZ", aprovado no CEP com o número 0016.0.009-02 e coordenado pelo Dr. Armando de Oliveira Schubach. Os pacientes assinaram o TCLE para a realização da rotina e/ou entrada no Programa de Leishmanioses do IPEC. Para o desenvolvimento deste projeto com relação à validação diagnóstica, que utiliza amostras séricas dos pacientes do projeto acima citado os responsáveis assinarão um Termo de Compromisso e Responsabilidade. Ressalta-se que não haverá impacto no PA da Unidade.

"Avaliação do ensaio imunoenzimático (ELISA) de frações solúvel e enriquecida com membrana de cepas infectivas e não infectivas de *Leishmania Viannia braziliensis*".

4. Diligências:

Sim. Informar as características da casuística, bem como assinalar se grupos especiais não serão incluídos no estudo. Esclarecer se está correto assinalar não no item da folha de rosto que se refere a Banco de Materiais Biológicos e certificar a adequação à resolução 347/2005. Ajustar cronograma. Foram satisfeitas.

5. Parecer:

APROVADO.

Data: 08 de novembro de 2007.



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

ANEXO C - Termo de Compromisso e Responsabilidade.

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, Sonia Regina Lambert Passos, coordenadora do projeto de pesquisa intitulado **“Avaliação por ensaio imunoenzimático (ELISA) de frações solúvel e enriquecida com membrana de cepas infectivas e não infectivas de *Leishmania Viannia braziliensis*”**, comprometo manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

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, ___ de _____ de 200__

Sônia Regina Lambert Passos

Fernanda Carvalho de Queiroz Mello

Jamyra Iglesias Silva

