

**Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto René Rachou  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**APLICABILIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E SOROS HIPERIMUNES,  
NA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, PARA  
O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

por

Juliana Wilke Saliba

Belo Horizonte

2019

**DISSERTAÇÃO**

**MCS – IRR J. W. SALIBA**

**2019**

**JULIANA WILKE SALIBA**

**APLICABILIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E SOROS HIPERIMUNES,  
NA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, PARA O DIAGNÓSTICO DA  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde – área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas não Transmissíveis.

**Orientação:** Dr. Edward José de Oliveira  
**Coorientação:** Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier

Belo Horizonte  
2019

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

S165a  
2019

Saliba, Juliana Wilke.

Aplicabilidade de anticorpos monoclonais e soros hiperimunes, na técnica de imuno-histoquímica, para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar / Juliana Wilke Saliba. – Belo Horizonte, 2019.

XII, 73 f.: il.; 210 x 297 mm.

Bibliografia: f. 57- 67

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas não Transmissíveis.

1. Diagnóstico Laboratorial/métodos 2. Leishmaniose Mucocutânea/diagnóstico 3. Técnicas Imunomarcadoras I. Título. II. Oliveira, Edward (Orientação). III. Pascoal Xavier, Marcelo Antônio (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.075

**JULIANA WILKE SALIBA**

**APLICABILIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E SOROS  
HIPERIMUNES, NA TÉCNICA DE IMUNO-HISTOQUÍMICA, PARA O  
DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde – área de concentração: Doenças Infecto-Parasitárias e Crônicas não Transmissíveis.

**Banca Examinadora**

Dr. Edward José de Oliveira – IRR – FIOCRUZ MINAS (Orientador/ Presidente)

Dra. Érica Alessandra Rocha Alves – IRR – FIOCRUZ MINAS (Titular)

Dra. Luciana de Almeida Silva Teixeira – UFTM (Titular)

Dr. Felipe Dutra Rêgo – IRR – FIOCRUZ MINAS (Suplente)

**Dissertação Defendida dia 26/02/2019**

“A minha irmã, Soraya,  
que sempre foi um exemplo, me incentivou  
e fez com que esse sonho se tornasse possível.”

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, por todo apoio, amor e carinho. Vocês são a base da minha vida. Mãe, obrigada pelo incentivo e por estar sempre por perto. Grande parte desse trabalho foi realizado graças a você! Leila, Soraya e Gabriel, vocês são meus exemplos e maior motivo para eu ser quem eu sou. Obrigada pela amizade e por simplesmente serem assim!

Gostaria de agradecer aos meus orientadores, Dr. Edward e Dr. Marcelo, por todo ensinamento, companheirismo e paciência. Dr. Edward, muito obrigada por toda história que construímos juntos nesses anos, juntamente com todo ensinamento, paciência, compreensão e confiança. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui. Dr. Marcelo, obrigada pelos novos ensinamentos, por todos elogios, e por acreditar em mim. Seu jeito de ser me ajudou muito a acreditar que eu conseguiria chegar ao final. Muito obrigada por tudo!

Aos colaboradores, Dra. Vanessa Peruhype, Dr. Wagner Tafuri e Dra. Silvane Murta, pela doação dos anticorpos, tornando possível o desenvolvimento desse trabalho.

À Fernandinha, pela ajuda, ensinamentos, paciência e amizade. A parte prática desse trabalho não poderia ter sido em melhor companhia.

À MSc. Ana Luísa, pela colaboração e por acrescentar mais ainda para os resultados desse trabalho.

Aos pesquisadores do PCPP, em especial à Dra. Taynãna Simões e Dr. Daniel Avelar, pela disponibilidade, ajuda e ensinamentos.

Aos meus amigos e irmãos que o PCPP e a vida tornaram possível que eu conhecesse: Arthur, Camila, Carol, Daniel, Dian, Diana, Dudu, Eliza, Jussara, Karine, Larinha, Lindoca, Mari Freire, Nay, Rosi e Vv. Obrigada pelo carinho e por compartilharem todos esses momentos sensacionais. Vocês fizeram essa etapa ser um dos melhores momentos da minha vida. Sem vocês, nada disso teria sentido. É um amor incondicional que eu tenho certeza que só vocês entendem.

A minha querida filhinha de coração, Bruninha, e também à Wanessa, por toda amizade, incentivo, carinho, companheirismo e risadas. Obrigada por toda ajuda. Sem vocês, essa caminhada não teria sido tão leve! Vocês me ensinaram muito.

A todos meus amigos do René, que sabem o quanto são importantes para mim e sempre estiveram ao meu lado.

A todos meus amigos, obrigada pelo apoio e compreensão, e por entenderem a minha ausência.

Ao Instituto René Rachou por meio do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por possibilitar a realização desse trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudos para realização desse trabalho.

A todos os professores e colegas que contribuíram para meu crescimento técnico-científico, ajudando de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”*

Simone de Beauvoir



## RESUMO

Existem diferentes métodos descritos para o diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar (LT). A imuno-histoquímica (IHQ) é considerada uma técnica alternativa e complementar do exame histopatológico para o diagnóstico da doença. Entretanto, as evidências sobre a aplicabilidade, reprodutibilidade e o desempenho de anticorpos monoclonais e soros hiperimunes disponíveis para a técnica de IHQ são relativamente escassas. Por isso, foram selecionados, a partir de uma pesquisa de anticorpos comerciais ou registrados em base de dados, dois anticorpos monoclonais (AcMo), um anti-*Leishmania* A2 (AcMo-A2) e outro anti-*Leishmania* GP63 (AcMo-GP63), e incluídos dois soros hiperimunes, um produzido contra a proteína recombinante KMP-11 de *L. braziliensis* (SH-KMP-11) e outro obtido de um “pool” de soros de cães diagnosticados com leishmaniose visceral (SH), para a realização deste trabalho. A padronização da técnica de IHQ foi realizada em amostras de lesões de pele de hamsters infectados experimentalmente com *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. O desempenho da técnica de IHQ, usando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes foi avaliado em 72 amostras de lesões de pacientes com suspeita clínica de LT, atendidos no Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto René Rachou/FIOCRUZ. Os resultados foram interpretados por três observadores independentes, de acordo com os critérios “Topografia”, “Localização” e “Forma”. A maior sensibilidade e área sob a curva (AUC) da técnica de IHQ foram de 66,1% e 0,761 com o uso do SH para diagnóstico da LT. Ao comparar os resultados da IHQ com outros exames de referência, foi observado que a IHQ e o exame direto (*imprint*) apresentaram uma proporção de 73,4% de casos corretos e a IHQ e a PCR convencional uma proporção de 70,8% de casos corretos. A concordância entre os observadores variou conforme o critério de análise morfológica e o propósito da interpretação da IHQ. Adicionalmente, os resultados da técnica de IHQ foram muito influenciados pelo tempo de evolução da lesão. A positividade da IHQ nas lesões recentes, com tempo menor ou igual a 75 dias, foi quatro vezes maior (*Odds ratio* = 4,04) que nas lesões antigas. Os resultados obtidos nesse estudo confirmam que a técnica de IHQ, usando soro hiperimune de cão, constitui uma importante ferramenta no diagnóstico laboratorial da LT.

**Palavras-chave:** leishmaniose tegumentar, diagnóstico laboratorial, técnica de imuno-histoquímica, anticorpo monoclonal, soro hiperimune

## ABSTRACT

Different methods are described for the laboratory diagnosis of tegumentary leishmaniasis (TL). Immunohistochemistry (IHC) is considered an alternative and complementary technique of histopathological examination for the diagnosis of TL. However, evidences on the applicability, reproducibility and performance of available monoclonal antibodies and hyperimmune sera are relatively scarces. Therefore, two monoclonal antibodies (mAb), one anti-*Leishmania* A2 (AcMo-A2) and one anti-*Leishmania* GP63 (mAb-GP63) were selected from a commercial antibody database, and included two hyperimmune sera, one produced against *L. braziliensis* recombinant protein KMP-11 (HS KMP-11) and the other obtained from a pool of sera from dogs diagnosed with visceral leishmaniasis (SH) for the accomplishment of this work at the Reference Center on Leishmaniasis of the René Rachou / FIOCRUZ Institute. The standardization of the IHC technique was performed on samples of skin lesions of hamsters experimentally infected with *L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. guyanensis*. The performance of the IHC, using mAb or HS was evaluated in 72 lesion samples from patients with clinical suspicion of TL and interpreted by three independent observers according to the "Topography", "Location" and "Shape" criteria. The highest sensitivity and area under the curve (AUC) of the IHC technique were 66.1% and 0.761, respectively, with HS. When comparing the results of the IHC with other reference exams, it was observed that the IHC and the direct examination (imprint) had a proportion of 73.4% of correct cases and the IHC and the conventional PCR had a proportion of 70.8% of correct cases. The agreement between the observers varied according to the criterion of morphological analysis and the purpose of the interpretation of the IHC. In addition, the results of the IHC technique were strongly influenced by the time evolution of the lesion. The IHC positivity in the recent lesions, with time less than or equal to 75 days, was four times greater (Odds ratio = 4.04) than in the old lesions. The results obtained in this study confirm that the IHC technique, using hyperimmune dog sera, is an important tool in laboratory diagnosis of LT.

**Keywords:** cutaneous leishmaniasis, laboratory diagnosis, immunohistochemistry, monoclonal antibody, hyperimmune serum

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Fluxograma para o diagnóstico laboratorial de LC, recomendado pelo Ministério da Saúde.....	21
<b>Figura 2</b> - Delineamento do estudo.....	39
<b>Figura 3</b> - Procedência da população de estudo .....	41
<b>Figura 4</b> - Classificação dos grupos de participantes .....	42
<b>Figura 5</b> - Microfotografia de corte histológico.....	43
<b>Figura 6</b> - Curva ROC do desempenho da técnica de IHQ, usando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes .....	45
<b>Figura 7</b> - Distribuição dos resultados apresentados pela técnica de IHQ, usando soro hiperimune de cão, definidos pelos observadores 1 e 2.....	46
<b>Figura 8</b> - Concordância dos resultados definidos pelos observadores 1 e 2, para cada critério.....	49
<b>Figura 9</b> - Associação dos resultados apresentados pela técnica de IHQ, usando soro hiperimune de cão, e tempo de evolução da lesão.....	50

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Diluições dos anticorpos monoclonais e soros hiperimunes utilizados na técnica de IHQ..... 37

**Tabela 2** – Desempenho da técnica de IHQ, utilizando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes ..... 43

**Tabela 3** - Comparação dos resultados apresentados pela técnica de IHQ, utilizando soro hiperimune de cão, com os dos exames de referência para o diagnóstico da LT.....46

**Tabela 4** – Desempenho da técnica de IHQ, utilizando soro hiperimune de cão, apresentado pelos “Observadores 1 e 2”, de acordo com os diferentes critérios empregados ..... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AcMo** = Anticorpo monoclonal

**AcMo-A2** = Anticorpo monoclonal anti-*Leishmania* A2

**AcMo-GP63** = Anticorpo monoclonal anti-*Leishmania* GP63

**SH-KMP-11** = Soro hiperimune de coelho anti- KMP-11

**SH** = Soro hiperimune de cão anti- *L. infantum*

**AUC** = *Area Under Curve* (Área sob a curva)

**CPPI** = Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos

**CRL** = Centro de Referência em Leishmanioses

**DAB** = Diaminobenzidina

**FIOCRUZ** = Fundação Oswaldo Cruz

**IDRM** = Intradermorreação de Montenegro

**IFI** = Imunofluorescência indireta

**IHQ** = Imuno-histoquímica

**IRR** = Instituto René Rachou

**LAMP** = *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (Amplificação Isotérmica Mediada por Loop)

**LT** = Leishmaniose tegumentar

**LC** = Leishmaniose cutânea

**LCL** = Leishmaniose cutânea localizada

**LCD** = Leishmaniose cutânea difusa

**LM** = Leishmaniose mucosa

**MMII** = Membros inferiores

**MMSS** = Membros superiores

**MS** = Ministério da Saúde

**OMS** = Organização Mundial da Saúde

**OPAS** = Organização Pan-Americana da Saúde

**PCR** = *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

**PCPP** = Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias

**qPCR** = *Real Time Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real)

**ROC** = *Reiceved Operating Characteristic* (Curva ROC)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1. Leishmaniose tegumentar</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2. Diagnóstico</b> .....	<b>18</b>
3.2.1. Diagnóstico Clínico .....	18
3.2.2. Diagnóstico Laboratorial .....	19
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1. Tipo de estudo</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2. População de estudo</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3. Local de desenvolvimento do estudo e rotina de investigação</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4. Busca e seleção de anticorpos anti-<i>Leishmania</i> spp.</b> .....	<b>29</b>
<b>4.5. Padronização da técnica de imuno-histoquímica</b> .....	<b>31</b>
4.5.1. Infecção experimental dos animais .....	31
4.5.2. Processamento das amostras biológicas .....	31
4.5.3. Técnica de imuno-histoquímica .....	32
<b>4.6. Avaliação da técnica de IHQ, usando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes, para o diagnóstico da LT</b> .....	<b>33</b>
4.6.1. Critérios de seleção e inclusão .....	34
4.6.2. Critérios de exclusão .....	34
4.6.3. Grupo de participantes .....	34
4.6.4. Coleta das amostras dos participantes .....	34
4.6.5. Processamento das amostras de pele .....	36
4.6.6. Técnica de imuno-histoquímica .....	36
4.6.7. Leitura e interpretação dos resultados da técnica de imuno-histoquímica .....	37
<b>4.7. Aspectos éticos</b> .....	<b>38</b>
<b>4.8. Análises estatísticas</b> .....	<b>39</b>

<b>5. RESULTADOS</b> .....	39
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>APÊNDICE 1 – Dados clínicos dos participantes do estudo</b> .....	68
<b>ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto René Rachou</b> .....	70

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias, negligenciadas, classificadas em duas principais formas, segundo suas manifestações clínicas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). A LV acomete vários órgãos como baço, medula óssea, e fígado. Por outro lado, a LT causa lesões na pele, em partes expostas do corpo, e dependendo da espécie do parasito, pode causar destruição das mucosas do nariz, boca e garganta. A LT é a forma da doença mais prevalente, com uma estimativa de um milhão de novos casos por ano no mundo (WHO, 2015).

No Brasil, a LT é uma doença amplamente distribuída, com elevada incidência (131.003 casos novos entre 2007 e 2012) e alto custo médio anual por internação hospitalar (R\$ 312.289,00/ano) (BRASIL, 2015). O diagnóstico definitivo da doença humana baseia-se, fundamentalmente, na pesquisa do parasito em amostras biológicas. Entretanto, as taxas de sensibilidade das técnicas disponíveis (exame direto, cultura e histopatológico) são consideradas muito baixas. Testes imunológicos também apresentam sensibilidade muito baixa para LT, e não são recomendados para o diagnóstico da doença, com exceção da Intradermoreação de Montenegro, que apresenta uma alta sensibilidade, porém uma baixa especificidade. Alternativas mais recentes, para detecção e identificação de *Leishmania* spp., incluem as técnicas moleculares. Contudo, essas técnicas são complexas, caras, estão restritas aos centros de referência e ainda não estão totalmente padronizadas.

Nesse contexto de restrições e limitações no diagnóstico laboratorial da LT, a imunohistoquímica (IHQ) se fortalece como importante técnica para a detecção do parasito. Esta técnica utiliza anticorpos e conjugados enzimáticos para localizar e identificar antígenos (particulados ou solúveis), presentes no tecido infectado. Assim, a padronização da técnica de imunohistoquímica (IHQ), aplicando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes já existentes, poderá, futuramente, viabilizar o desenvolvimento de um *kit* protótipo de IHQ para o diagnóstico laboratorial da LT.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar a aplicabilidade de anticorpos monoclonais e soros hiperimunes, na técnica de imuno-histoquímica, para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar.

### 2.2. Objetivos específicos

- Selecionar anticorpos monoclonais e soros hiperimunes, com potencial aplicação na técnica de imuno-histoquímica, para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar;
- Padronizar e avaliar o desempenho da técnica de imuno-histoquímica, utilizando os anticorpos monoclonais e soros hiperimunes selecionados;
- Comparar os resultados da técnica de imuno-histoquímica apresentados por diferentes observadores;
- Associar os resultados apresentados pela técnica de imuno-histoquímica com o tempo de evolução da lesão;
- Comparar os resultados da técnica de imuno-histoquímica com o exame direto (*imprint*), PCR convencional e/ou microcultivo, realizados na rotina do Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Leishmaniose tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários da família *Trypanosomatidae*, pertencentes ao gênero *Leishmania*, (ROSS, 1903; BASANO; CAMARGO, 2004). Segundo Lainson & Shaw (1987), as espécies desse gênero são divididas em dois subgêneros - *Viannia* e *Leishmania*, classificação proposta de acordo com desenvolvimento do parasito no flebotomíneo, o vetor da doença.

São descritas ao menos 20 espécies do parasito que causam a doença no mundo. No Brasil, as principais espécies causadoras de LT são a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (V.) guyanensis*, sendo a *L. braziliensis* a espécie de maior importância epidemiológica, por apresentar alta prevalência (LAINSON, 2010; BRASIL, 2017). Ainda, casos de LT causados pelas espécies *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi* e *Leishmania (V.) lainsoni* (SHAW & LAINSON, 1975; LAINSON & SHAW 1987) também são notificados nos estados do Norte e Nordeste do país.

A LT é endêmica em 88 países, sendo a maior parte dos casos reportados no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria. No período de 2010 a 2015 foram relatados cerca de um milhão de novos casos no mundo, com estimativa de aproximadamente 431 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (WHO, 2015).

Nas Américas, a LT é endêmica em 18 países, distribuídos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (OPAS/OMS, 2018). No Brasil, o número de casos notificados de LT tem aumentado nos últimos anos, sendo descritos casos autóctones em todos os estados do país (MARTINS et al., 2014; BRASIL, 2017; GOSCH et al., 2017). De 2007 a 2016, foram notificados uma média de 21.650 novos casos da doença por ano (BRASIL, 2018).

De acordo com Negrão & Ferreira (2009), existem dois padrões epidemiológicos da doença na América do Sul: o padrão clássico, sendo representado por surtos epidêmicos em regiões onde ocorre derrubada de matas, para construção de estradas e povoados; e transmissão em regiões associadas às formas de ocupação do espaço, principalmente região rural, embora a transmissão também ocorra em áreas urbanas. Análises epidemiológicas demonstram uma transgressão do padrão de transmissão da LT, antes, restrita ao ambiente silvestre, acometendo acidentalmente pessoas que entram em florestas, passando então a ocorrer amplamente em zonas rurais e regiões periurbanas (BRASIL, 2017).

A transmissão da doença ocorre através da picada de fêmeas de insetos da subfamília Phlebotominae (ROSS, 1903; CUPOLILLO; MOMEN; GRIMALDI, 1997; DESJEUX, 2004). Os parasitos, em sua forma promastigota procíclica, se multiplicam por divisão binária no intestino do flebótomo. Ao final da metacicloênese, processo pelo qual o parasito para de se reproduzir e se torna infectante, o parasito, já na forma promastigota metacíclica, migra para as glândulas salivares do inseto, que, ao realizar o repasto sanguíneo em animais vertebrados, regurgita os parasitos na junção epiderme-derme do hospedeiro, juntamente com a saliva, que possui substâncias que exacerbam a infecção (STRAZZULLA, 2013; BRASIL, 2017). No hospedeiro vertebrado, os parasitos são fagocitados por células do sistema fagocítico-mononuclear, entre elas os macrófagos. Através de processos bioquímicos, os parasitos sofrem transformações morfológicas e passam a apresentar uma forma arredondada e sem flagelo livre, denominada forma amastigota (MARZOCHI, 1992; BRASIL, 2017). Nos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, os parasitos, na forma amastigota, se multiplicam, por divisão binária, até romper a célula hospedeira, sendo liberados para infectar outras células, propagando assim a infecção (MARZOCHI, 1992).

Dependendo da espécie de *Leishmania*, da resposta imune do hospedeiro e o vetor envolvido na transmissão, as manifestações clínicas da LT podem se apresentar de diferentes formas (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010). As lesões podem demorar algumas semanas ou meses para se desenvolver, e quase sempre se iniciam como pequenas pápulas vermelhas que variam entre 5 a 10 mm,

podendo evoluir para nódulos eritematosos, placas endurecidas, placas escamosas ou úlceras com bordas em relevo (MAGILL, 2005; DAVID & CRAFT, 2009).

Sendo assim, a LT é uma doença considerada polar ou espectral, classificação proposta por Destombes (1960) ao comparar as alterações histopatológicas da doença com as alterações apresentadas na hanseníase, doença também considerada espectral (TURK & BRYCESON, 1971). Entre os polos, encontra-se a manifestação clínica mais frequente, a leishmaniose cutânea (LC), que representa cerca de 90% dos casos notificados em alguns países (SILVEIRA, LAINSON & CORBETT, 2004; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). Esta forma clínica é caracterizada por uma única lesão ou múltiplas lesões ulceradas na pele, de fundo granuloso e bordas elevadas, localizadas em partes expostas do corpo, onde, provavelmente, ocorreu a inoculação de formas promastigotas de *Leishmania* spp. através da picada do inseto vetor (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; AZEREDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014; BRASIL, 2017).

A forma menos frequente da doença é a leishmaniose disseminada (LD), que consiste em um grande número de lesões, que podem apresentar aspectos variados. Tem tendência à cura espontânea e boa resposta ao tratamento. (BRASIL, 2017).

No polo anérgico, representado pela leishmaniose cutânea difusa (LCD), há uma acentuada proliferação dos parasitos nas lesões devido à ausência de resposta imune mediada por células, levando à disseminação da infecção (CONVIT et al., 1993; AZEREDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014; BRASIL, 2017). A maioria dos casos de LCD são descritos em crianças que apresentavam lesões nodulares disseminadas, sem ulceração e ricas em formas amastigotas (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007; BRASIL, 2017).

Em contraste, no polo hiperérgico, representado pela leishmaniose mucosa (LM), são descritos moderados níveis de anticorpos circulantes e um baixo número de parasitos presentes nas lesões (CASTES et al., 1983; CARVALHO et al., 1985; CONVIT et al, 1993; AZEREDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014). A forma clássica da LM pode ocorrer em pacientes que não apresentaram sintomas anteriores de

outra forma de LT, mas é descrita geralmente em pacientes que tiveram LC e não receberam tratamento adequado, sendo considerada lesão secundária de baixa incidência, que acomete cerca de 3% a 6% dos pacientes notificados com LT no Brasil (BRASIL, 2017). Esta forma clínica acomete as mucosas das vias aéreas superiores, e pode levar à destruição de cavidades oro-nasais e faríngeas (DESJEUX, 1996).

### **3.2. Diagnóstico**

Aproximadamente 16% dos casos de LT notificados no Brasil, entre 2007 e 2012, foram confirmados somente por critério clínico-epidemiológico (Instituto René Rachou, 2018). Esse alto percentual de casos sem diagnóstico laboratorial pode estar relacionado à falta de acessibilidade ao diagnóstico para populações que vivem em determinadas áreas do país, principalmente nas regiões rurais, onde há maior prevalência da doença (BRASIL, 2017). É indispensável levar em consideração, além dos aspectos clínicos e epidemiológicos, os exames laboratoriais, sendo necessário, na maioria dos casos, uma associação desses dados (FURTADO, 1980; GONTIJO & CARVALHO, 2003; GOTO & LINDOSO, 2010).

#### **3.2.1. Diagnóstico Clínico**

O diagnóstico clínico da LT é dificultado pela diversidade de formas clínicas e grande variedade de lesões (SARAVIA et al 1989; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Além disso, outras doenças infecciosas apresentam manifestações clínicas similares ao da LT, que pode ser confundida com esporotricose, infecção cutânea por *Mycobacterium* spp., tuberculose, paracoccidiodomicose cutânea, ceratoacatoma, carcinoma basocelular, piodermites, histiocitoma, dentre outras, e apresentam co-endemicidade, sendo necessário realizar o diagnóstico diferencial (REITHINGER et al., 2007; DAVID & CRAFT, 2009; HANDLER et al., 2015). Outro fator importante para que seja realizada a confirmação laboratorial são os efeitos colaterais dos medicamentos utilizados para o tratamento da doença (BRASIL, 2005). Segundo Goto & Lindoso (2010), ainda não existe um medicamento que seja perfeitamente

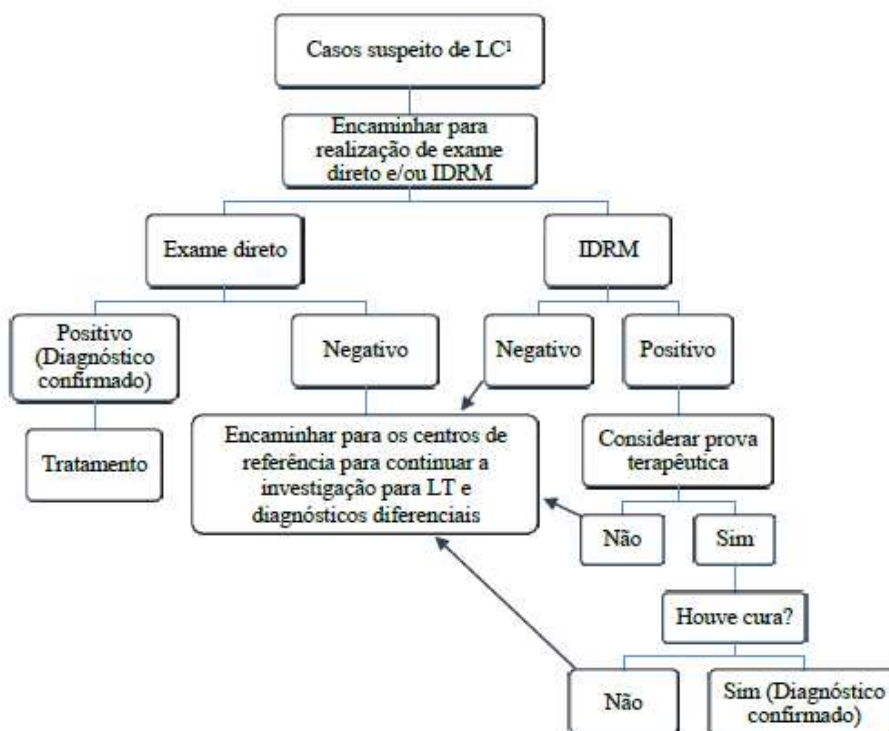
seguro ou completamente eficaz para o tratamento das leishmanioses. O antimoniato de meglumina, medicamento de primeira escolha, disponibilizado pelo Ministério da Saúde (MS), pode causar efeitos colaterais graves como cardiotoxicidade e a nefrotoxicidade.

### 3.2.2. Diagnóstico Laboratorial

Diferentes métodos, com grandes variações de desempenho, são descritos para o diagnóstico laboratorial da LT, incluindo técnicas parasitológicas, imunológicas, moleculares e histopatológicas (GOTO & LINDOSO, 2010; BRASIL, 2017). A sensibilidade dos métodos diagnósticos pode variar dependendo do laboratório que realiza a técnica, qualidade dos equipamentos e insumos, ou ainda, depende de fatores biológicos, como tempo de evolução da lesão, forma clínica e espécie do parasito envolvida (BRASIL, 2017).

O MS (2017) publicou o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar onde consta um fluxograma para a realização do diagnóstico laboratorial em caso de suspeita de LC (Figura 1). A recomendação do MS é que sejam realizados exame direto e Intradermorreação de Montenegro (IDRM) em pacientes com lesões características, que residam ou não em áreas endêmicas. Caso o resultado das técnicas seja negativo, os pacientes serão encaminhados para os centros de referências para investigação de LT, através das técnicas parasitológicas, moleculares ou histopatológicas.

**Figura 1-** Fluxograma de diagnóstico da leishmaniose cutânea



Fonte: SVS/MS

**¹ Caso suspeito de LT cutânea:** indivíduo com presença de lesões de pele ulceradas ou não com 3 semanas ou mais de evolução em paciente residente ou exposto à área de transmissão.

### 3.2.2.1. Método Parasitológico

As técnicas diretas são consideradas como “referência” no diagnóstico da LT por apresentarem alta especificidade e são os procedimentos de primeira escolha por serem mais rápidos, de fácil execução e menor custo (VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; BRASIL, 2017). A sensibilidade dessas técnicas é variável, de acordo com a forma clínica da doença e tempo de evolução da lesão (HERWALDT, 1999; VEGA-LÓPES, 2003).

A pesquisa direta do parasito, pode ser realizada usando-se material biológico obtido por meio da coleta por escarificação, biópsia ou punção aspirativa da lesão (MARZOCHI & MARZOCHI, 1994; NAIFF, 1997; KASSI et al., 2004; LIMA JUNIOR, 2009; MARTINS, 2014; BRASIL, 2017). Esse material pode ser preparado em lâminas de vidro e corado para pesquisa do parasito por meio da visualização

microscópica (DE MELLO et al., 2011). Em material biológico obtido a partir da biópsia ou punção aspirativa da lesão, também é possível proceder com cultivo *in vitro*, para demonstração da presença dos parasitos. Essa técnica consiste em inocular o material coletado da lesão em meio de cultivo bifásico NNN (Novy-McNeal-Nivolle) e LIT (Liver Infusion Triptose) e incubar em temperaturas entre 24°C e 26°C, para que ocorra a diferenciação e multiplicação do parasito (BRASIL, 2017). A maior vantagem dessa técnica é a possibilidade de isolamento dos parasitos para análise pós-cultivo, incluindo testes de caracterização de espécies e suscetibilidade a medicamentos (BOGGILD et al., 2008). Por outro lado, o cultivo tem como desvantagens a demora na liberação do resultado e necessidade de infraestrutura laboratorial, ficando restrito a centros de referência (GONTIJO 2003; ASHFORD, 2000; VAN DER MEIDE *et al.*, 2005).

Para o exame direto, a sensibilidade descrita varia entre 17 a 83% e para cultivo *in vitro* de 27 a 85% (BENSOUSSAN et al., 2006). As técnicas parasitológicas necessitam de profissionais treinados para a detecção de *Leishmania* spp. nas preparações examinadas.

#### 3.2.2.2. Método Imunológico

O teste cutâneo da Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é considerado um valioso recurso diagnóstico, apresentando alta sensibilidade. A IDRM mensura a hipersensibilidade celular tardia, porém, o teste não diferencia doença atual ou pregressa, e sua especificidade é baixa, apresentando reação cruzada em pacientes com outras doenças (MONTENEGRO, 1926; SHAW & LAINSON, 1975; MEDEIROS *et al.*, 2002). O teste é realizado aplicando-se 0,1 mL de antígeno, preparado a partir de extrato de promastigotas de *Leishmania* spp., na face anterior do antebraço do paciente. A leitura é realizada de 48 a 72h após aplicação do antígeno e o resultado é considerado positivo caso haja endureção igual ou superior a 5 mm de diâmetro, na área da aplicação. Atualmente o teste não está disponível no Brasil devido à suspensão da produção do antígeno de Montenegro, pelo Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (CPPI), por falta de adequações na estrutura física da área de produção.



Semelhante à IDRM, os testes sorológicos baseiam-se na mensuração da resposta imune do hospedeiro, por meio da detecção de anticorpos anti-*Leishmania* específicos. Devido à fraca resposta imune humoral produzida nos pacientes com LT, na forma cutânea e cutânea disseminada, os níveis de anticorpos circulantes são muito baixos ou não detectáveis pelos testes sorológicos atuais, resultando em uma baixa sensibilidade no diagnóstico da doença (KAR, 1995; SALMAN *et al.*, 1999; GOTO & LINDOSO, 2010). Por outro lado, os pacientes com LT, na forma difusa e mucosa, apresentam moderados níveis de anticorpos circulantes. Nesses casos, a reação de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando antígenos particulados, e ensaio imunoenzimático de ELISA, produzidos tanto com antígenos brutos (extratos totais a partir de cultura de parasito) quanto com antígenos recombinantes, podem auxiliar no diagnóstico da doença (RYAN *et al.*, 2002; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015, OLIVEIRA, 2018). Entretanto, atualmente, o uso desses testes não está indicado, pois seus resultados não contribuem para o diagnóstico laboratorial da LT.

### 3.2.2.3. Método Molecular

Uma importante ferramenta para o diagnóstico da LT são as técnicas moleculares. São altamente eficazes, e dependendo do alvo utilizado, pode ser considerado o método mais sensível para o diagnóstico da LT (DISCH, *et al.*, 2005; ANDERS *et al.*, 2002). Entretanto, são técnicas muito dispendiosas, que dependem de insumos, profissionais qualificados e infraestrutura laboratorial, características que dificultam a realização da técnica em campo (TAVARES; FERNANTES; MELO, 2003; MURRAY *et al.*, 2005; LUZ, *et al.*, 2009). Além disso, não existem protocolos definidos, por isso há grande variação no desempenho em função das diferentes metodologias empregadas (CRUZ *et al.*, 2013).

Embora existam diferentes técnicas moleculares avaliadas para o diagnóstico da LT, ensaios baseados na Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) constituem a principal abordagem de diagnóstico molecular (REITHINGER & DUJARDIN, 2007). Essa técnica é baseada na amplificação *in vitro* de sequências específicas de DNA a partir de iniciadores (*primers*), que se ligam por complementariedade em regiões a serem copiadas (PERSING *et al.*, 1993; SINGH, 1997). Dentre os alvos utilizados, o

DNA do cinetoplasto (kDNA), é um excelente alvo utilizado para o diagnóstico de LT, por ser uma estrutura conservada em os tripanosomatídeos (BORST & HOEIJMAKERS, 1979).

Técnicas moleculares de PCR utilizando equipamento simples estão sendo aperfeiçoadas para o diagnóstico da LT. A técnica de LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), utiliza somente um equipamento para aquecimento (banho maria, termobloco ou termociclador) para realizar a amplificação, e o resultado pode ser visualizado a olho nu, através da turbidez pela formação de pirofosfato de magnésio ou utilizando corante intercalante de DNA, que se torna verde na presença de produtos amplificados, e laranja na ausência (REITHINGER & DUJARDIN, 2007).

#### 3.2.2.4. Exames Histopatológicos

Os exames histopatológicos são realizados para avaliar alterações microscópicas no tecido e detectar agentes infecciosos presentes no tecido. No Brasil, os estudos dessas alterações causadas por *Leishmania* spp. tiveram início quando a doença foi identificada pela primeira vez no país. Desde então, diversos autores têm trabalhado para estabelecer os padrões morfológicos característicos da doença (BOTELHO et al, 1998). Ao notar semelhanças da LT com a hanseníase, Destombes (1960) propôs um estabelecimento de sistematização polar para as apresentações clínicas da doença. A partir de então, diversos autores propuseram uma classificação histopatológica levando em consideração a semelhança das duas doenças. Entretanto, algumas dessas classificações não consideravam alguns aspectos, como os fenômenos necróticos, ou não enfatizavam o prognóstico da lesão (BRYCESON, 1969; NICOLIS et al, 1978; RIDLEY, 1979; RIDLEY et al, 1980; RIDLEY & RIDLEY, 1984). Sendo assim, Magalhães e colaboradores (1986) descreveram as alterações histopatológicas básicas e evolutivas que ocorriam em lesões de pacientes com LT (leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e leishmaniose cutâneo-mucosa) causada por *L. braziliensis*, além de caracterizarem a resposta imune humoral e celular. A partir desse estudo, foi possível identificar cinco padrões histopatológicos: 1) Reação Exsudativa Celular, 2) Reação Exsudativa e Necrótica, 3) Reação Exsudativa e Necrótico-Granulomatosa, 4) Reação Exsudativa e Granulomatosa, e 5) Reação Exsudativa e Tuberculóide. O

mais frequente desses é a reação exsudativa celular, tanto na forma cutânea como na mucosa (MAGALHÃES et al., 1986).

A histopatologia apresenta a vantagem de, com um único fragmento de biópsia, ser possível identificar as formas parasitárias e, ao mesmo tempo, realizar o diagnóstico diferencial de outras doenças (KENNER et al., 1999). Entretanto, a sensibilidade da técnica é baixa, e pode ser ainda menor em lesões muco-cutâneas (SINGH & SIVAKUMAR, 2003). Apesar de apresentar padrões histopatológicos, não é possível diagnosticar a LT sem que o parasito seja visualizado, já que outras doenças podem apresentar achados histopatológicos semelhantes (SOLOMON et al., 2016; MILLER et al., 2012). Sendo assim, alguns estudos e esforços têm sido realizados com o objetivo de associar metodologias auxiliares, como a imuno-histoquímica para aumentar a acurácia do diagnóstico laboratorial da LT (KENNER et al., 1999).

Outra técnica amplamente empregada para identificação de diferentes microrganismos através da análise microscópica é a hibridização *in situ*. Essa técnica consiste na utilização de sondas marcadas por fluoróforos em amostras de pele conservadas em parafina (PCPP, 2018). São descritos estudos utilizando a hibridização *in situ* em amostras de cães infectados com *Leishmania* spp., e alguns estudos padronizando a técnica em amostras de pacientes com LC (KEMPF et al., 2000; DINHOPL et al., 2011; MENEZES et al., 2013). Apesar de ser uma técnica muito utilizada para o diagnóstico laboratorial de outras doenças, ainda não é muito empregada para LT (FURTADO et al., 2015).

#### 3.2.2.4.1. Técnica de Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica que se baseia na demonstração do parasito ou antígeno *in situ* em secções de tecido, por meio de ligações com anticorpos específicos, sendo revelados por conjugados enzimáticos, que produzem reação de coloração visível ao microscópio ótico (MIGHELL, 1998; RAMOS-VARA, 2005). A técnica é simples, apresenta alta sensibilidade e especificidade para espécies de *Leishmania* e não necessita de equipamentos especiais para sua realização (LIVNI et al., 1983; QUINTELLA et al., 2009). Segundo Duraiyan e

colaboradores (2012), a técnica de IHQ, utilizando anticorpos monoclonais ou policlonais, é uma ferramenta importante no arsenal do patologista para o diagnóstico da LT.

Para realização da técnica, são utilizados anticorpos primários, secundários ou terciários ligados a marcadores para permitir a visualização do agente infeccioso ou antígenos (TAYLOR et al., 2002; LUCOQ; ROTH, 1985). Os marcadores mais empregados são as enzimas, a exemplo da peroxidase e fosfatase alcalina, mas também podem ser utilizados marcadores fluorescentes e metálicos (RAMOS-VARA, 2005). Essas enzimas marcadoras foram desenvolvidas a partir da década de 60, através da ligação covalente ou de pontes naturais, que na presença de substrato específico e um cromógeno, irão produzir um precipitado colorido no sítio da reação antígeno-anticorpo (BARBOSA, 1988; AVRAMEAS, 1972; NAKANE; PIERCE, 1967).

O sistema de detecção da IHQ pode variar, sendo descritos a utilização de métodos diretos e indiretos. O método direto é considerado o método mais simples e rápido da IHQ, porém a sensibilidade não é suficiente para detectar a maioria dos antígenos em tecidos processados rotineiramente (RAMOS-VARA, 2005). A reação é realizada em uma etapa, utilizando anticorpo primário conjugado a um marcador, que pode ser fluorocromo, enzima ou ouro coloidal (POLAK; VAN NOORDEN, 2003).

Os métodos indiretos são realizados em duas etapas, onde o anticorpo primário, específico e com maior afinidade, se liga ao antígeno, seguido do anticorpo secundário conjugado, que se liga ao anticorpo primário (TAYLOR et al., 2002). Esses métodos são mais sensíveis se comparados ao método direto, porque permitem que o anticorpo primário, sem um marcador, mantenha sua atividade, e que mais de um anticorpo secundário conjugado se ligue ao anticorpo primário, amplificando o sinal. Além disso, os métodos indiretos são mais versáteis, pois um único anticorpo secundário conjugado pode ser utilizado para diferentes anticorpos primários. Isso ocorre em razão do anticorpo secundário ser produzido em um animal diferente da espécie que o anticorpo primário foi derivado (POLAK; VAN NOORDEN, 2003). Outra vantagem é que o anticorpo primário pode ser utilizado com uma diluição mais alta sem prejudicar o desempenho da técnica (TAYLOR et

al., 2002).

A técnica de IHQ, para detecção de amastigotas de *Leishmania* spp., vem sendo descrita desde a década de 80 (LIVNI et al., 1983; BARBOSA et al. 1988; SALINAS et al., 1989; KENNER et al., 1999; QUINTELLA et al., 2009). Estudos comparando seu desempenho com exame histopatológico demonstraram o bom desempenho da IHQ, utilizando anticorpos monoclonais, e ressaltaram a superioridade da visualização dos parasitos em relação à técnica histopatológica convencional (SELLS & BURTON, 1981; LYNCH et al., 1986; SOTTO et al., 1989; SALINAS et al., 1989; SCHUBACH et al., 2001). Outros estudos também demonstraram resultados promissores da técnica de IHQ utilizando diferentes anticorpos. No Irã, Shirian e colaboradores (2014) compararam o desempenho da técnica de IHQ, utilizando anticorpo monoclonal, com a PCR convencional e a técnica histopatológica. Os autores observaram um desempenho similar ao da PCR, com altas taxas de sensibilidade e especificidade.

No Brasil, dois trabalhos, de um mesmo grupo, utilizaram um *pool* de soros hiperimunes de cão para o estabelecimento de protocolos para a técnica de IHQ. No primeiro estudo, realizado por Alves e colaboradores (2013), a sensibilidade da técnica de IHQ foi de 91,8%. No trabalho mais recente, a IHQ foi realizada com amostras provenientes de diferentes estados do Brasil e apresentou uma sensibilidade de 70,5% (MARQUES et al., 2017). O *pool* de soros hiperimunes, utilizado nos dois estudos, é proveniente de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Segundo os autores, os soros hiperimunes que compõem o *pool* foram triados através de testes sorológicos e fazem parte de várias linhas de pesquisa sobre leishmaniose visceral canina no Departamento de Patologia e Parasitologia/ICB/UFMG (MARQUES et al., 2017; ALVES et al., 2013).

Os trabalhos que avaliaram a técnica de IHQ, para diagnóstico laboratorial da LT, disponíveis na literatura, são escassos e os que foram publicados, avaliaram a IHQ utilizando anticorpos genéricos ou soros hiperimunes. Com base nos resultados desses trabalhos a IHQ se fortalece como uma técnica alternativa para o diagnóstico da LT. Dessa forma, é necessário avaliar a aplicabilidade de anticorpos monoclonais e soros hiperimunes na técnica de IHQ, para o diagnóstico da LT. Os resultados

desse trabalho poderão gerar evidências técnico-científicas para a recomendação da IHQ, utilizando anticorpo monoclonal ou soro hiperimune, no diagnóstico da LT.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Tipo de estudo**

Trata-se de um estudo descritivo, observacional e transversal, do tipo prova de conceito da técnica imuno-histoquímica.

### **4.2. População de estudo**

Pacientes adultos com suspeita de LT atendidos em serviço de referência para diagnóstico e tratamento de leishmaniose em Minas Gerais, no período de 01/05/2016 a 31/12/2017.

### **4.3. Local de desenvolvimento do estudo e rotina de investigação**

Este estudo foi realizado no Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto René Rachou/FIOCRUZ (CRL/IRR/FIOCRUZ) e no Laboratório do Grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias (PCPP/IRR/FIOCRUZ). O CRL/IRR/FIOCRUZ configura-se como uma unidade assistencial ambulatorial em Belo Horizonte, Minas Gerais, integrada ao Sistema Único de Saúde (SUS) e credenciado pelo Ministério da Saúde como referência técnica nacional em LT. Anualmente são realizadas cerca de 900 consultas e entre 90-120 pacientes são diagnosticados com LT, dos quais 8-15% apresentam a forma mucosa. De acordo com a rotina de investigação de LT no CRL/IRR/FIOCRUZ, pacientes com suspeita da doença são examinados e submetidos à coleta de fragmento tecidual da lesão, por meio de biópsia. Parte desse fragmento é usado para a realização do exame direto e depois armazenada em congelador -20°C para posterior realização da PCR, e a outra parte é mantida em formol 10% e, caso o resultado do exame direto seja negativo, a amostra é encaminhada para exame histopatológico. Paralelamente, é coletado aspirado de lesão para realização de microcultivo. Até janeiro de 2016, nos casos suspeitos de LT era realizado o teste de IDRM, cuja execução foi suspensa em fevereiro de 2016 por indisponibilidade do antígeno de Montenegro, que teve sua produção interrompida.

A parte experimental desse estudo foi desenvolvida no laboratório do PCPP /IRR/FIOCRUZ, que oferece suporte de diagnóstico laboratorial ao CRL/IRR/FIOCRUZ. O laboratório do PCPP/IRR/FIOCRUZ está focado em realizar pesquisa, desenvolvimento tecnológico, inovação e formação de recursos humanos relacionados ao diagnóstico, à clínica, à terapêutica e ao controle de doenças infecciosas e parasitárias de importância social no Brasil. No laboratório do PCPP são realizados exames parasitológicos, sorológicos por técnicas tradicionais e novas metodologias, desenvolvidas e padronizadas no laboratório.

#### **4.4. Busca e seleção de anticorpos anti-*Leishmania* spp.**

Para verificar o arsenal de anticorpos monoclonais, comercialmente disponíveis, com potencial aplicabilidade na técnica de imuno-histoquímica para diagnóstico da LT, foi realizada uma busca sistematizada de artigos científicos, que utilizaram anticorpos comerciais ou disponíveis na base de dados *Medline do PubMed – U. S. National Library of Medicine*, durante o período de 05 a 20 de maio de 2017. Foram utilizadas as seguintes estratégias de busca:

- 1- (cutaneous leishmaniasis [MeSH Terms]) AND immunohistochemistry [Text Word], 133 artigos (08/05/2017)
- 2- (cutaneous leishmaniasis [MeSH Terms]) AND antibodies, monoclonal [Text Word], 118 artigos.

Não foram encontrados artigos que descrevem a utilização de anticorpos monoclonais, comercialmente disponíveis, na IHQ para o diagnóstico da LT na busca realizada. Com isso, foi realizada uma busca sistematizada no sítio eletrônico Google para avaliar os anticorpos de empresas comerciais disponibilizados *online*. As palavras-chave utilizadas na busca foram: “anti-*leishmania*” e “monoclonal”.

Apesar de terem sido encontrados três anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis, foram selecionados apenas dois, sendo um anti-*Leishmania* A2 (AcMo-A2) ab150344 (Abcam, Cambridge, Cambs, Reino Unido) e outro anti-*Leishmania* GP63 (AcMo-GP63) OBT2004 (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos da América).



O desempenho do anticorpo anti-*Leishmania* LPG já foi descrito em outro estudo e por isso não foi incluído no presente trabalho (ALVES et al., 2013).

Segundo o fabricante, o AcMo-A2, reconhece a proteína A2 das espécies de *L. donovani* e *L. infantum*, especificamente na forma amastigota. O antígeno A2 é uma proteína encontrada no retículo endoplasmático de algumas espécies de *Leishmania*, exclusivamente na forma amastigota (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994; CARVALHO et al., 2002; COELHO et al., 2003). A proteína A2 apresenta um importante papel na virulência dessas espécies, sendo demonstrado em alguns estudos que organismos com deficiência em A2 são incapazes de infectar macrófagos e camundongos (ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001).

De acordo com o fabricante, a proteína GP63 de *L. major* foi produzida na forma recombinante, utilizando Baculovírus. A GP63 é uma importante proteína localizada na membrana de *Leishmania* spp. capaz de hidrolisar uma grande variedade de substratos, tanto do parasito quanto do hospedeiro (BIANCHINI et al, 2006; HSIAO et al, 2008; KAUR; SOBTI; KAUR, 2011). Ela é produzida no retículo endoplasmático do parasito, e possui uma massa molecular de 63 kDa. Muitas espécies de *Leishmania* possuem diversas classes de genes, que codificam para a GP63, que são diferentemente regulados durante o ciclo de vida do parasito, tanto na forma promastigota como na forma amastigota (MEDINA- ACOSTA et al., 1993).

Além desses, também foram incluídos dois soros hiperimunes, sendo um produzido em coelho contra a proteína recombinante KMP-11 (SH-KMP11) de *L. braziliensis* (TESSAROLLO, 2013) e outro obtido de um “pool” de soro de cães diagnosticados com leishmaniose visceral (SH) (ALVES et al., 2013). A proteína 11 de membrana de cinetoplastídeos (KMP-11) é considerada um dos principais constituintes da membrana celular de cinetoplastídeos. É expressa tanto na forma promastigota, quanto na forma amastigota, porém a expressão é maior na forma amastigota, o que demonstra um possível papel na relação do parasito com o hospedeiro mamífero. Essa proteína está localizada ao redor da bolsa flagelar, vesículas intracelulares e flagelo (STEBECK et al. 1995; SAHOO, 2009; SHARMA et al., 2013; SANNIGRAHI et al., 2017).

#### 4.5. Padronização da técnica de imuno-histoquímica

Para padronização da técnica de IHQ, foram obtidas amostras de pele, coletadas por biópsia, de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados experimentalmente, segundo protocolo do grupo de Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto René Rachou/FIOCRUZ (PCPP/IRR/FIOCRUZ).

##### 4.5.1. Infecção experimental dos animais

Hamsters machos, pesando aproximadamente 134,2g ( $\pm 4,0$ ), previamente anestesiados e tricotomizados foram infectados na pata, por meio de injeção subcutânea com 200  $\mu$ L de promastigotas em fase estacionária, na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos/mL. Cada hamster foi infectado, separadamente, com cepas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/2013/20 LTA AA) e, após surgimento da lesão característica, a úlcera da pata dos animais foi retirada com o auxílio de pinça e bisturi e mantidas em formaldeído 10% até o processamento.

##### 4.5.2. Processamento das amostras biológicas

As amostras mantidas em formaldeído 10% (Êxodo científica, Nova Veneza, SP, Brasil) foram submetidas ao processamento histológico utilizando o Processador Automático de Tecidos Modelo PT05 (Lupetec, São Carlos, SP, Brasil). As amostras foram desidratadas por imersão em álcool etílico (Synth, Diadema, SP, Brasil) a 70% por 1 hora, 95% por 1 hora e 99,5% por 1 hora. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em acetato de N-butila P.A. (Synth, Diadema, SP, Brasil) por uma hora, e xileno P.A. (NEON, Suzano, SP, Brasil) por 3 horas. Logo após, as amostras foram embebidas em parafina líquida à 56°C (Grupo Erviegas/Easypath, São Paulo, SP, Brasil), por duas horas. As amostras foram inseridas em bloco de parafina, seccionadas em cortes de espessura de quatro micrômetros, com o auxílio de um micrótomo modelo Leica RM2125RT (Leica Biosystem, Wetzlar, He, Alemanha), e

dispostas em lâminas de vidro para a padronização da técnica de imunohistoquímica.

As lâminas contendo corte histológico de hamster, infectados experimentalmente com *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* foram mantidas em estufa 56°C, por aproximadamente 18 horas, desparafinadas em xilol histológico (Sciavicco, Belo Horizonte, MG, Brasil) por 20 minutos, e banhadas em álcool etílico absoluto 99,5°GL (EMFAL, Betim, MG, Brasil) por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada por meio do aquecimento à 90°C, utilizando um vaporizador (Cuisinart, Stamford, Connecticut, Estados Unidos da América), com as lâminas imersas em solução tampão de citrato de sódio 0.01M (pH 6,0), por 30 minutos e resfriadas por 20 minutos em temperatura ambiente.

#### 4.5.3. Técnica de imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada utilizando o *kit* Novolink™ Max Polymer Detection System (Leica Biosystem, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Com o objetivo de definir as melhores condições da reação, as lâminas contendo corte histológico de hamster, infectados experimentalmente com *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* (item 4.5.1 e 4.5.2), foram submetidas a diferentes tempos de incubação de cada reagente que compõe o *kit* Novolink™, em comparação ao recomendado pelo protocolo do fabricante. Diante dos resultados prévios, obtidos nessa etapa de padronização, constatou-se a necessidade de alterar o tempo de incubação do bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio das proteínas e mistura cromógena (Peroxido de Hidrogênio+ Diaminobenzidina- DAB). Além disso, foram testadas diferentes diluições para cada anticorpo monoclonal ou soro hiperimune, para que fossem definidas as melhores diluições a serem utilizadas no estudo. Foram testadas as diluições 1:100, 1:500, 1:1.000, 1:2.000, 1:3.000, 1:4.000 e 1:5.000, para o AcMo-A2; 1:500, 1:1.000 e 1:2.000, para AcMo-GP63; 1:000, 1:2.000; 1:5.000, para SH-KMP-11 e 1:100, 1:250, 1:500, 1:1.000, 1:1.500 e 1:2.000 para SH. Determinadas as melhores condições de reação, o protocolo final definido foi:

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado adicionando-se 50 µL, em cada corte, da solução “Peroxidase Block”, e incubando-se as lâminas por 30 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. Na sequência, as lâminas foram lavadas duas vezes com tampão Tris (TBS) 50 mM (pH 7,6). Para inibir as reações inespecíficas, foram adicionados, a cada corte, 50 µL da solução “Protein Block”, incubando-se as lâminas por 30 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas duas vezes com TBS, e na sequência, adicionados 50 µL, em cada corte, do AcMo-A2, previamente diluído 1:5.000 em diluente de anticorpo, e as lâminas foram incubadas por uma hora, em câmara úmida e temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas três vezes com TBS, e para ativar a penetração do polímero, foram adicionados, a cada corte, 50 µL da solução “Post Primary”, incubando-se as lâminas por 30 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com TBS, e foram adicionados 50 µL, em cada corte, do polímero “Novolink™ Polymer”, incubando-se as lâminas por 30 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. A solução foi removida com TBS, e a reação foi revelada adicionando-se 50 µL, em cada corte, do substrato/cromógeno DAB (Peroxido de Hidrogênio + 3,3'-diaminobenzidina), incubando-se as lâminas por 40 segundos, em câmara úmida e temperatura ambiente. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina por 2 minutos, lavadas em água corrente por 5 minutos, desidratadas com três banhos de cinco minutos em álcool absoluto 99,5° GL, diafanizadas em xilol histológico e montadas com Entellan® (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) e lamínulas.

O mesmo protocolo acima foi realizado, utilizando AcMo-GP63 na diluição 1:2.000, SH- KMP- 11 na diluição 1:2000, e SH na diluição 1:150.

#### **4.6. Avaliação da técnica de IHQ, usando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes, para o diagnóstico da LT**

Na avaliação da aplicabilidade de anticorpos monoclonais e soros hiperimunes na técnica de IHQ, para diagnóstico da LT, foram utilizadas amostras de pele, coletadas por biópsia da lesão de pacientes com suspeita de LT atendidos no CRL/IRR/FIOCRUZ, no período de 01/05/2016 a 31/12/2017, de acordo com os critérios abaixo:

#### 4.6.1. Critérios de seleção e inclusão

Os critérios de seleção e inclusão dos participantes nesse projeto foram:

- a) Pacientes com idade superior a 18 anos;
- b) Pacientes que foram atendidos no CRL/IRR/FIOCRUZ;
- c) Pacientes com suspeita de LT, com indicação e realização de biópsia de pele e/ou mucosa para o diagnóstico de LT;
- d) Pacientes que possuíam fragmento de biópsia de pele e/ou mucosa com tamanho superior a três milímetros.

#### 4.6.2. Critérios de exclusão

- a) Pacientes que apresentavam recidivas de LT;
- b) Pacientes cujas amostras apresentavam artefatos por processamento histológico;
- c) Pacientes que possuíam fragmento de biópsia de pele e/ou mucosa com tamanho inferior a três milímetros.

#### 4.6.3. Grupo de participantes

Foram incluídos 72 participantes que cumpriram os critérios de seleção e inclusão citados anteriormente, entre casos e não-casos. O diagnóstico dos pacientes, realizado na rotina do CRL/IRR/FIOCRUZ, levou em consideração o exame clínico, resultados dos exames laboratoriais e resposta terapêutica ao tratamento.

#### 4.6.4. Coleta das amostras dos participantes

A coleta da biópsia de lesão dos participantes com suspeita de LT foi realizada no ambulatório do CRL/IRR/FIOCRUZ por profissional médico, no período de 01/05/2016 a 31/12/2017. Inicialmente, foi realizada a limpeza da lesão com solução salina 0,9% e assepsia da pele circunjacente com iodo-polvidona a 10% e aplicado cloridrato de lidocaína 2% para anestésiar o local. Em seguida, um fragmento de pele da borda da lesão foi coletado utilizando instrumento cirúrgico cortante circular (*punch*) de três milímetros de diâmetro. Esse material foi dividido em duas partes,

sendo que, uma parte foi utilizada na confecção de lâminas para exame direto e depois congelada para posterior realização da PCR convencional, ambos realizados na rotina do CRL/IRR/FIOCRUZ. A segunda parte do fragmento de pele foi mantida em formaldeído 10% e processada para ser examinada por meio da técnica de imuno-histoquímica. Essas amostras foram codificadas e randomizadas para realização de estudo cego.

O exame direto foi realizado na rotina por profissional técnico do CRL/IRR/FIOCRUZ, pressionando o fragmento de biopsia (*imprint*) oito vezes contra a superfície da lâmina para microscopia, com o auxílio de uma pinça estéril, gerando oito diferentes “carimbos” para serem examinados. As lâminas foram secadas em temperatura ambiente e a preparação foi fixada com metanol e corada com Giemsa. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico, na objetiva de 100x e óleo de imersão, com o objetivo de encontrar formas amastigotas do parasito.

A PCR convencional foi realizada por profissional técnico na rotina do CRL/IRR/FIOCRUZ. Resumidamente, o DNA total das amostras dos fragmentos de pele foi extraído por meio do kit DNA QIAamp FFPE (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo protocolo do fabricante. A reação de PCR foi realizada de acordo com protocolo descrito por Disch e colaboradores (2003) com modificações validadas no laboratório do grupo PCPP/IRR/FIOCRUZ. Para cada amostra, foi preparado uma reação com volume final de 25µL, contendo 1,5 unidades de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1µL de tampão da enzima (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), iniciador senso: 150 (5'GGGG TAG GGG CGT TCTC GCG AA 3') e anti-senso:152 (3' C GC GC GA TCT ATA TTT ACA CCA ACC CC 5') (IDT, Coralville, IA, EUA) (Degrave et al., 1994) a 0,6 µM cada, 2,0 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,2 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, Estados Unidos da América), 10 ng/µL de DNA e volume de água ultrapura para completar 25µL. O programa de ciclagem foi realizado no termociclador ProFlex PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e consistiu em uma etapa a 95 °C por 5 min, seguida de 34 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 50 segundos e uma etapa final de 60°C por 5 minutos. Em cada ensaio foram incluídos um controle negativo contendo mix da PCR sem o DNA e um controle positivo constituído por DNA de *L. braziliensis*.

Como controle do procedimento de extração de DNA e de amplificação, foi amplificado uma sequência do gene que codifica para a  $\beta$ -actina humana, utilizando iniciadores Aco1 (5'-ACCTCA TGAAGATCCTCACC-3') e Aco2 (5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3'), que geram um produto de 120 pares de base (MUSSO et al. 1996). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corado com solução de nitrato de prata 0,2 %.

O microcultivo de material biológico, foi realizado por profissional técnico na rotina do CRL/IRR/FIOCRUZ, utilizando aspirado de lesão coletado com o auxílio de tubos de coleta de sangue sem anticoagulante contendo 2 mL de meio NNN e 200  $\mu$ L de salina com antibiótico Penicilina/Estreptomicina nas concentrações de 100 U/mL e 100  $\mu$ g/mL, respectivamente (Gibco/Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos da América). Foram utilizados três tubos por paciente. Esses tubos foram mantidos em B.O.D à 26°C por até 21 dias, realizando-se leituras periódicas em microscópio ótico a fim de verificar a presença de promastigotas de *Leishmania* spp. Após 21 dias, quando não evidenciado a presença de parasitos, o resultado foi considerado negativo.

#### 4.6.5. Processamento das amostras de pele

Os fragmentos de pele dos participantes foram processados segundo protocolo descrito no item 4.5.2.

#### 4.6.6. Técnica de imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada utilizando o kit Novolink™ Max Polymer Detection System, segundo protocolo do fabricante com pequenas modificações definidas nesse estudo (item 4.5.3). A diluição utilizada no estudo para cada anticorpo testado consta na Tabela 1.

**Tabela 1** - Anticorpos e suas diluições utilizadas na realização da técnica de IHQ para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp.

ANTICORPO	DILUIÇÃO
AcMo-A2	1/5.000
AcMo-GP63	1/2.000
SH-KMP-11	1/2.000
SH	1/150

**Fonte:** elaborado pelo autor

#### 4.6.7. Leitura e interpretação dos resultados da técnica de imuno-histoquímica

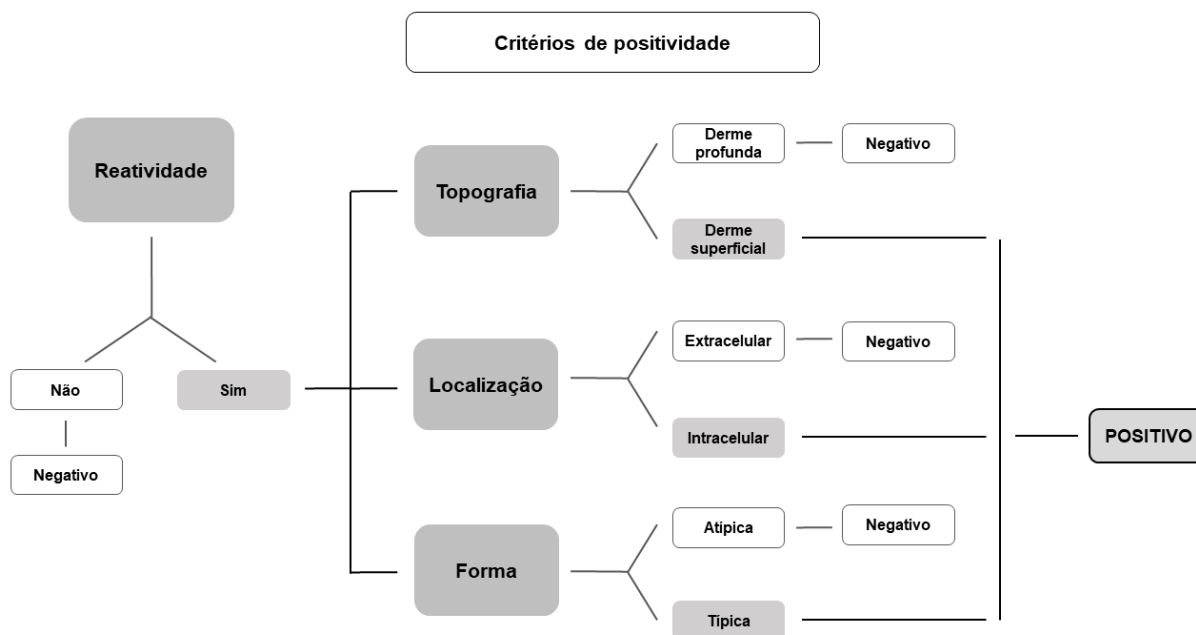
A leitura das lâminas foi realizada em microscópio ótico, usando as objetivas de 40x e 100x, por três observadores, sendo:

- “Observador 1”: experiência técnica de patologista;
- “Observador 2”: experiência em pesquisa/diagnóstico;
- “Observador consenso”: ampla experiência de patologista e pesquisa/diagnóstico.

A interpretação das lâminas foi realizada considerando os critérios de positividade “Topografia”, “Localização” e “Forma”. Esses critérios foram definidos após revisão da literatura, afim de determinar a melhor forma de localizar amastigotas no tecido. Sendo assim, para que a amostra fosse considerada positiva, deveria ocorrer uma reatividade na derme superficial, localizada dentro da célula (intracelular), e apresentasse a aparência da forma amastigota, com a presença de núcleo e cinetoplasto. As amostras foram consideradas positivas somente quando preenchessem todos os critérios de positividade de acordo com o fluxograma (Figura 2).



**Figura 2** - Fluxograma dos critérios a serem considerados na leitura das lâminas



**Legenda:** Os critérios de positividade estão marcados em cinza, sendo a amostra considerada positiva somente quando todos os critérios forem preenchidos. **Fonte:** elaborado pelo autor

Inicialmente, os resultados foram analisados por dois observadores, “Observador 1” e “Observador 2”, e as interpretações, que apresentaram divergências entre os dois observadores, foram revisadas pelo “Observador consenso”. O resultado final das leituras foi definido pela leitura do “Observador consenso”.

#### 4.7. Aspectos éticos

O uso de animais nesse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (licença: LW-4/18).

O acesso ao prontuário dos pacientes para coleta de dados demográficos e clínicos, e uso das amostras para a realização desse estudo, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou/ FIOCRUZ (CAAE: 56188716.5.0000.5091).

#### **4.8. Análises estatísticas**

Foi criado um banco de dados no programa Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2016 contendo informações demográficas (sexo, idade, ocupação habitual, município e zona de residência) e dados clínicos (número de lesões, localização das lesões, tempo de lesão, tipo da lesão e resultados dos exames laboratoriais) dos participantes.

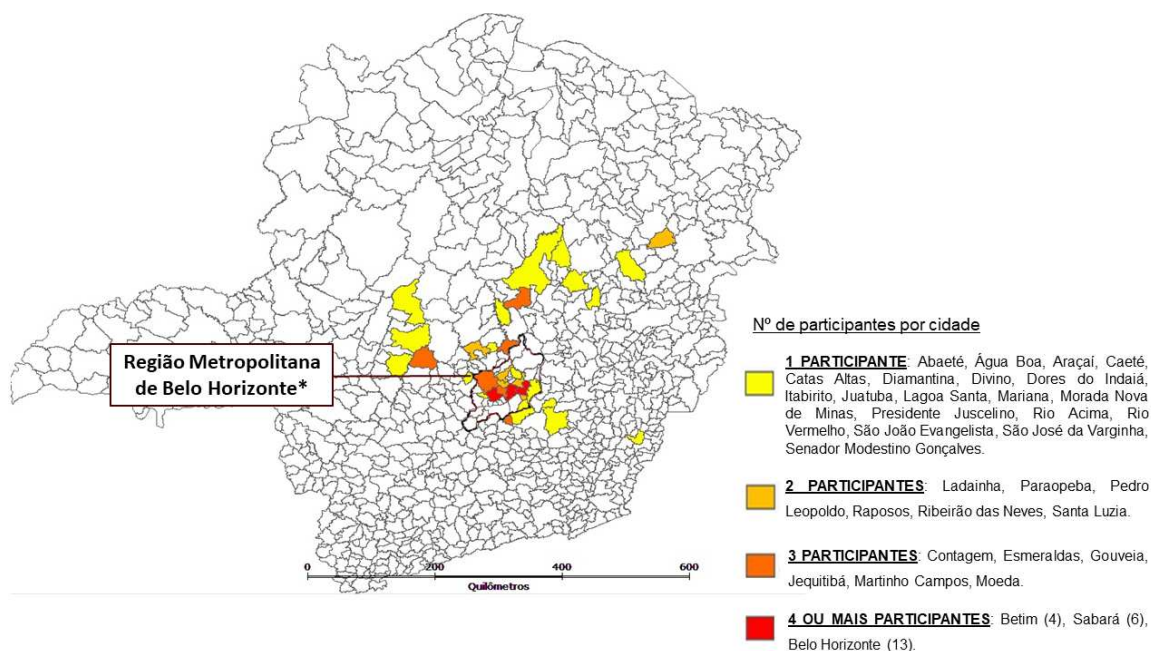
As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Minitab<sup>®</sup> Statistical Software 17 (State College, PA, EUA) e MedCalc Statistical Software v18.11 (Ostend, Flanders, Bélgica), e para produção do mapa, da origem dos participantes desse estudo, foi utilizado *software* TerraView v4.2.0 (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A sensibilidade, especificidade e acurácia foram calculadas através da análise em tabela de contingência 2x2 e da curva ROC (*Reiceved Operating Characteristic*), considerando o intervalo de confiança de 95%. A concordância dos resultados entre observadores foi calculada utilizando o índice Kappa (COHEN, 1960), interpretado de acordo com Landis & Kock (1977). A análise discriminante foi utilizada para classificação complementar dos resultados da técnica de IHQ, usando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes, independentemente da informação prévia de diagnóstico.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1. Dados demográficos e clínicos da população estudada**

Do total de 72 participantes incluídos nesse estudo, 79% eram do gênero masculino. A idade dos participantes variou de 19 a 92 anos, com mediana de 51 anos, sendo que 33% dos participantes tinham idade entre 49 e 63 anos. A maior parte dos participantes morava no interior do estado de Minas Gerais (43%), ou na região metropolitana de Belo Horizonte (39%), e somente 18% moravam na capital (Figura 3). Em relação à profissão, 21% dos participantes trabalhavam com atividades relacionadas à agropecuária, 26% eram aposentados, e 49% realizavam outras atividades como comerciante, eletricitista, funcionário público, garçomete, entre outros.

**Figura 3** - Local de residência dos participantes, proveniente de diferentes municípios do estado de Minas Gerais



**Legenda:** \*Região Metropolitana de Belo Horizonte: Betim, Caeté, Contagem, Esmeraldas, Juatuba, Lagoa Santa, Pedro Leopoldo, Raposos, Ribeirão das Neves, Rio Acima, Sabará, Santa Luzia. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Em relação às lesões, a maior parte dos participantes (75%) tinha lesões únicas, e outros participantes apresentaram duas lesões (13%), três lesões (8%), quatro lesões (1%) ou cinco lesões (3%) pelo corpo. Mais da metade das lesões estavam localizadas nos membros inferiores (MMII) (41%) e superiores (MMSS) (29%) e as outras lesões se encontravam na cabeça (16%) e tronco (14%). O tempo de evolução da lesão variou entre 30 e 730 dias, com mediana de 135 dias e média de 192,5 dias. Metade dos participantes relatava o aparecimento dos sintomas entre 30 e 75 dias e a outra metade entre 75 e 730 dias. O tipo de lesão mais prevalente foi úlcera (88%), seguido de placa (8%), nódulo (3%) e infiltração (1%) (APÊNDICE 1).

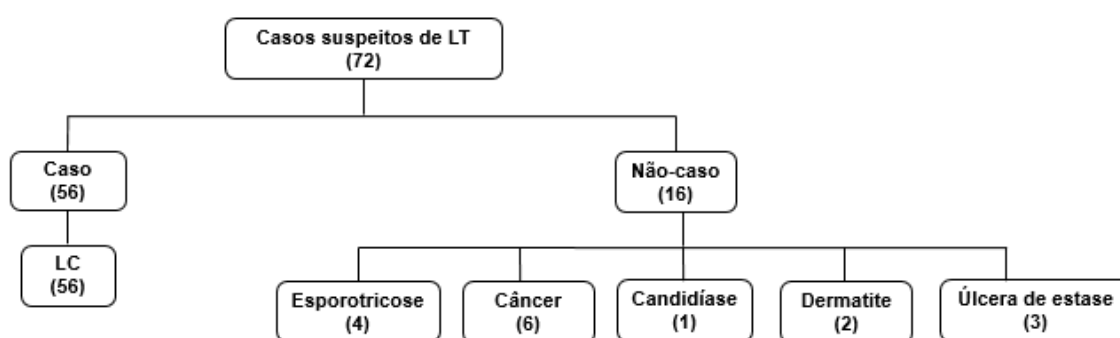
Após exame das lâminas, usando a técnica de IHQ, o banco foi aberto, e os participantes foram classificados em dois grupos, de acordo com os resultados dos exames clínico-laboratoriais, realizados no CRL/IRR/FIOCRUZ (Figura 4):

**Grupo caso:** composto por 56 participantes com diagnóstico confirmado para leishmaniose tegumentar, nas formas cutânea e/ou mucosa, por meio de exame

clínico e resultado positivo em ao menos uma das técnicas realizadas na rotina do CRL/IRR/FIOCRUZ (exame direto, cultura ou PCR convencional).

**Grupo não-caso:** constituído por 16 participantes que apresentavam suspeita de LT, porém tiveram diagnóstico confirmado para outras doenças (6 carcinomas de células escamosas (câncer), 4 esporotricose, 3 úlceras de estase, 1 dermatite e 1 candidíase).

**Figura 4** - Classificação do grupo de amostras e seus respectivos diagnósticos

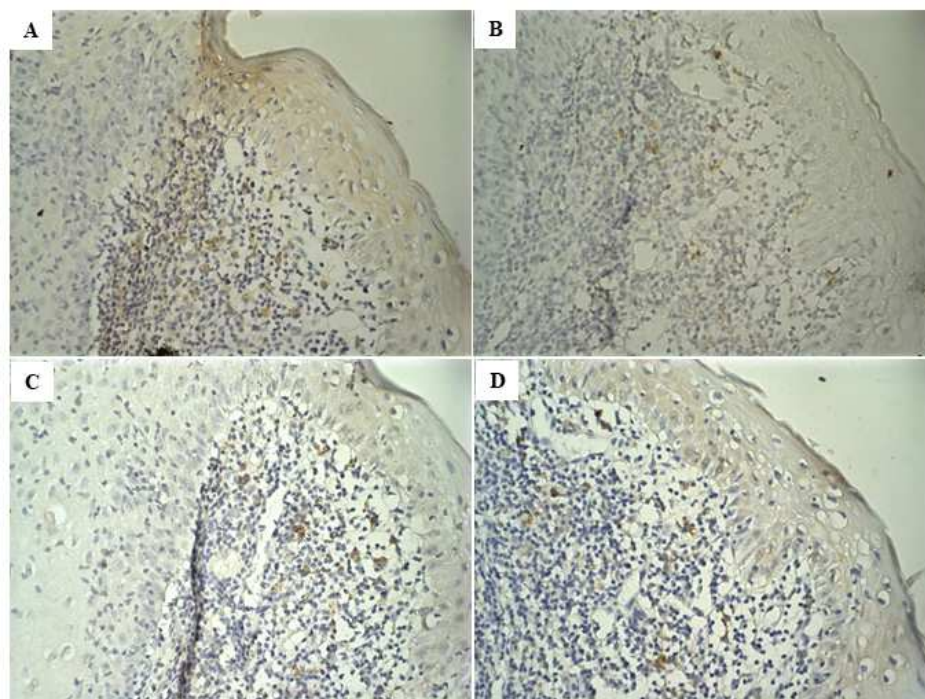


Fonte: elaborado pelo autor

## 5.2. Técnica de imuno-histoquímica

Os resultados obtidos foram avaliados levando em consideração os critérios de positividade, sendo consideradas positivas as lâminas que preenchem todos os critérios, como demonstrado na figura abaixo (Figura 5):

**Figura 5** – Microfotografia do corte histológico de amostra de pele de participante do estudo



**Legenda:** Técnica de imuno-histoquímica de amostra positiva de participante do estudo, utilizando AcMo-A2 (A), SH-KMP11 (B), AcMo-GP63 (C), e SH (D). **Fonte:** elaborado pelo autor

Os resultados da técnica de IHQ, após avaliação do “Observador consenso”, apresentou melhor sensibilidade utilizando SH (66,1%). Ao empregar o AcMo-GP63, a sensibilidade da técnica diminuiu para 14,5%. A técnica de IHQ, empregando o SH-KMP-11, apresentou sensibilidade de 10,7% e, empregando AcMo-A2, uma sensibilidade de 5,4% (Tabela 2).

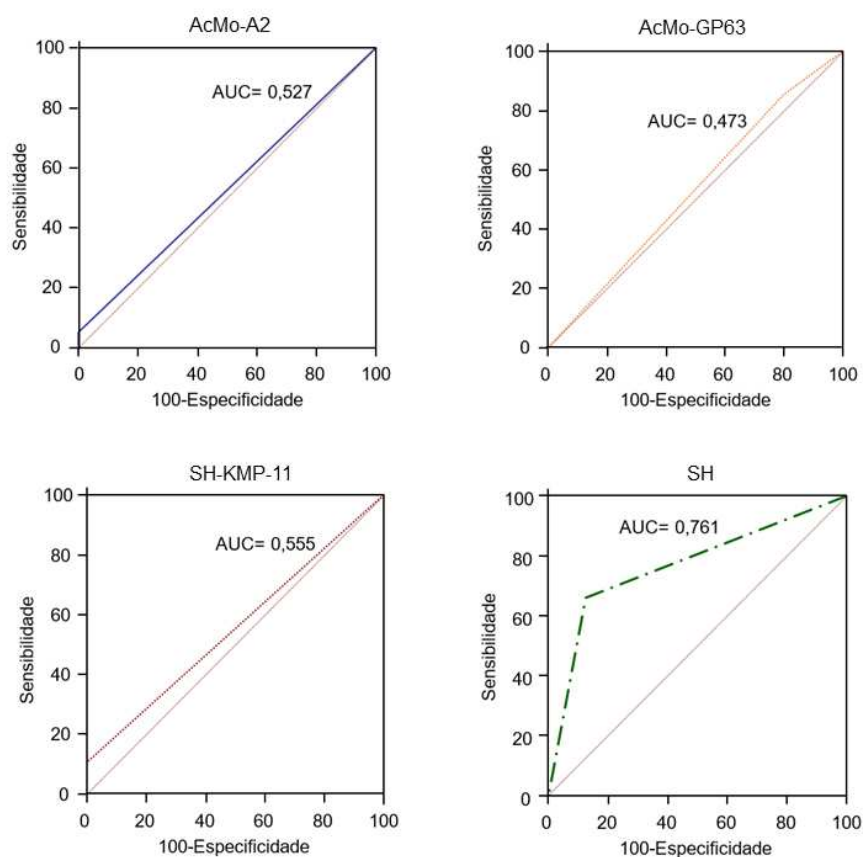
**Tabela 2** - Sensibilidade, especificidade e acurácia da técnica de imunohistoquímica, empregando anticorpos monoclonais e soros hiperimunes avaliados nesse estudo

<b>Anticorpos e Soros hiperimunes</b>	<b>Sensibilidade (n= 56) (%)</b>	<b>Especificidade (n= 16) (%)</b>	<b>Acurácia (n= 72) (%)</b>
AcMo-A2	5,4 (1,8- 14,6)*	100 (80,6 -100)	26,4 (17,6 – 37,6)
AcMo-GP63	14,5 (7,5 – 26,2)	80 (54,8 – 92,9)	28,6 (19,3 – 40,0)
SH-KMP-11	10,7 (5,0 -21,5)	100 (80,6-100)	30,6 (21,1 – 41,9)
SH	66,1 (53,0 – 77,1)	87,5 (64,0- 96,5)	70,8 (59,5 – 80,0)

**Legenda:** \*Intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** elaborado pelo autor

A análise da curva ROC mostrou que a maior área sob a curva (AUC) foi encontrada para os resultados da técnica de IHQ utilizando SH (0,761), seguida pelo uso do SH-KMP-11 (0,555), AcMo-A2 (0,527) e AcMo-GP63 (0,473) (Figura 6).

**Figura 6** - Área sob a curva dos resultados da técnica de IHQ usando o AcMo-A2, AcMo-GP63, SH-KMP-11 e SH

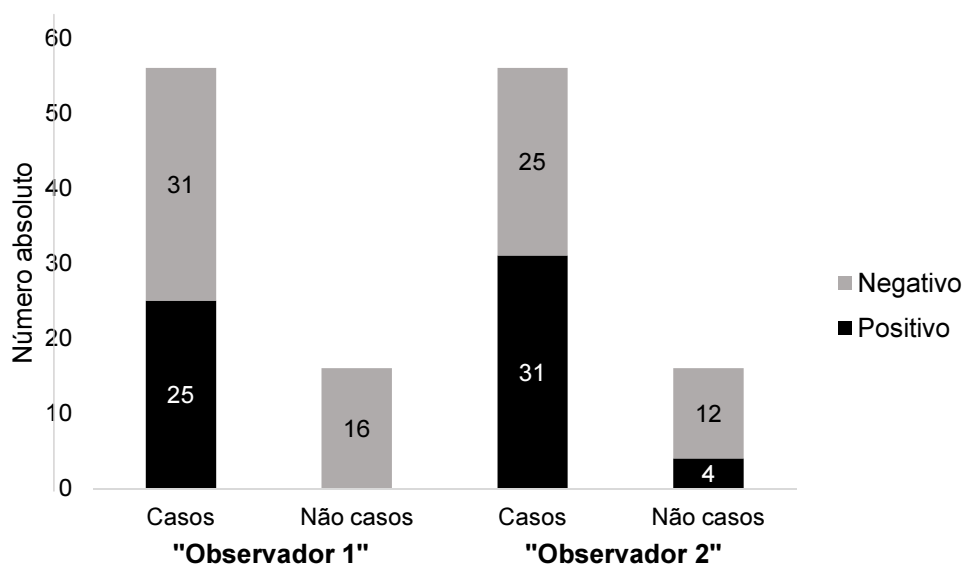


**Fonte:** elaborado pelo autor

Considerando o baixo desempenho apresentado pela técnica de IHQ utilizando AcMo-A2, AcMo-GP63 e SH-KMP-11, os resultados obtidos com o uso desses reagentes biológicos não foram incluídos nas análises seguintes.

A proporção de casos concordantes da técnica de IHQ utilizando SH foi avaliada separadamente para o “Observador 1” e “Observador 2”. Os resultados definidos pelo “Observador 1” apresentaram uma proporção de resultados concordantes de 56,9% (25 positivos e 16 negativos), e pelo “Observador 2”, a proporção de resultados concordantes foi de 59,7% (31 positivos e 12 negativos) (Figura 7).

**Figura 7** – Resultados concordantes, definidos pelo "Observador 1" e "Observador 2", através da imuno-histoquímica, utilizando SH



**Fonte:** elaborado pelo autor

Os resultados apresentados pela técnica de IHQ, utilizando SH, foram comparados com os das técnicas realizadas no CRL/IRR/FIOCRUZ. Foi observado uma concordância fraca ( $kappa = 0,42$ ) entre a técnica de IHQ e o exame direto (*imprint*), com uma proporção de 73,4% de casos concordantes. Comparando a técnica de IHQ com a PCR convencional, também foi observada uma concordância fraca ( $kappa = 0,39$ ), com uma proporção de casos concordantes de 70,8% (Tabela 3).



**Tabela 3** - Concordância de resultados entre IHQ e os testes realizados no CRL/IRR/FIOCRUZ

		IMUNO- HISTOQUÍMICA		
		Positivo	Negativo	
EXAME DIRETO	Positivo	33	12	<i>Kappa = 0,42</i>
	Negativo	5	14	
PCR	Positivo	37	19	<i>Kappa = 0,39</i>
	Negativo	2	14	

**Fonte:** elaborado pelo autor

Avaliando separadamente o resultado de cada critério de positividade, empregado para obtenção dos resultados da técnica de IHQ, foi possível observar que se a lâmina fosse avaliada considerando somente o critério “Topografia”, a sensibilidade dos resultados para o “Observador 1” seria de 64%, e para o “Observador 2” seria de 70%. Considerando somente o critério “Localização”, a sensibilidade dos resultados do “Observador 1” seria de 69% e do “Observador 2”, 79%. Empregando somente o critério “Forma”, a sensibilidade dos resultados do “Observador 1” seria de 47%, e do “Observador 2”, 55%. Ao avaliar todos os critérios juntos, considerando resultado positivo somente quando todos os critérios fossem positivos, a sensibilidade da técnica IHQ, definida com os resultados do “Observador 1” seria de 45%, e a sensibilidade dos resultados do “Observador 2” seria de 55% (Tabela 4).

**Tabela 4** - Sensibilidade e especificidade da técnica de IHQ, utilizando SH, segundo os critérios considerados na leitura das lâminas pelos “Observadores 1 e 2”

Critérios	Observador 1		Observador 2	
	Sensibilidade (n= 56) (%)	Especificidade (n= 56) (%)	Sensibilidade (n= 56) (%)	Especificidade (n= 56) (%)
<b>Topografia</b>	63,4 (50,0–75,1)*	100,0 (80,6–100,0)	69,6 (56,6–80,1)	31,2 (14,2–55,6)
<b>Localização</b>	69,1 (56,0–79,7)	100,0 (80,6–100,0)	78,6 (66,2–87,3)	25,0 (10,2–49,5)
<b>Forma</b>	47,3 (34,7–60,2)	100,0 (80,6– 100,0)	62,5 (49,4–74,0)	68,7 (44,4–85,8)
<b>Todos</b>	45,6 (32,4–57,6)	100,0 (80,6– 100,0)	55,4 (42,4–67,6)	75,0 (50,5–89,8)

**Legenda:** \*Intervalo de confiança de 95%. **Fonte:** elaborado pelo autor

Ao comparar os resultados da leitura das lâminas de cada observador, foi observada uma concordância fraca entre os “Observadores 1 e 2” (Índice *Kappa* = 0,38), concordância boa entre o “Observador 1” e “Observador consenso” (Índice *Kappa* = 0,63) e uma concordância moderada entre “Observador 2” e “Observador consenso” (Índice *Kappa* = 0,59).

Os resultados da técnica de IHQ, utilizando SH, considerando cada critério para leitura das lâminas, foram comparados entre “Observador 1” e “Observador 2”. Foi observada concordância insignificante (Índice *Kappa* = 0,13) para o critério “Topografia” e concordância fraca para os critérios “Localização” (Índice *Kappa* = 0,29) e “Forma” (Índice *Kappa* = 0,34) (Figura 8).

**Figura 8** - Concordância de resultados do critério “Localização” na técnica de IHQ utilizando SH, entre “Observador 1” e “Observador 2”

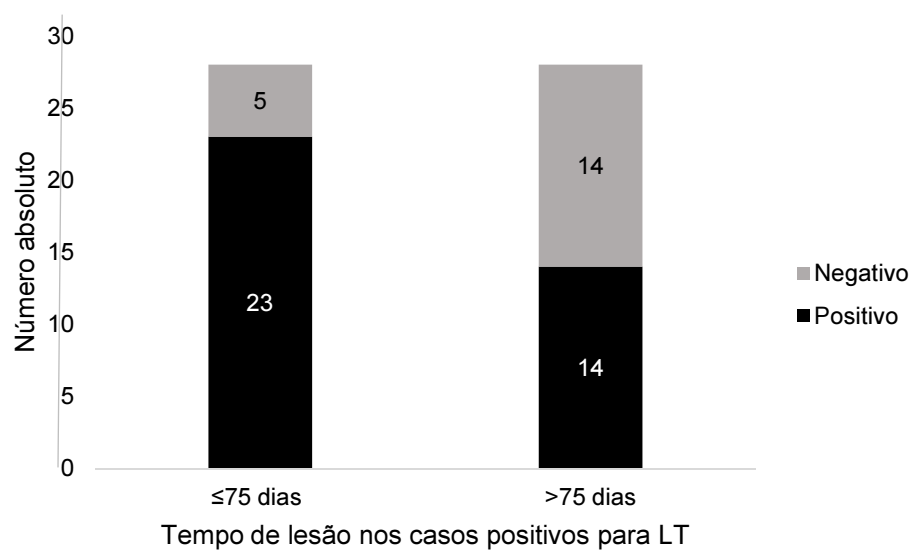
		TOPOGRAFIA		LOCALIZAÇÃO	
<b>(A)</b>		Kappa= 0,13		Kappa= 0,29	
		OBSERVADOR 1		OBSERVADOR 1	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
OBSERVADOR 2	Positivo	27	23	35	21
	Negativo	8	13	3	12
<b>(C)</b>		Kappa= 0,34		Kappa= 0,38	
		OBSERVADOR 1		OBSERVADOR 1	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
OBSERVADOR 2	Positivo	21	19	19	16
	Negativo	5	26	6	31
		FORMA		TODOS CRITÉRIOS	

**Fonte:** elaborado pelo autor

Os resultados da técnica de IHQ, usando SH, foram associados com o tempo evolução da lesão. Para aqueles participantes com tempo de lesão menor ou igual a 75 dias, foi encontrada maior chance de apresentar resultado positivo em relação aos participantes com tempo de lesão maior que 75 dias de evolução (*Odds ratio* = 4,04).

Dos 56 participantes diagnosticados com LT, metade apresentou tempo de evolução da lesão menor ou igual a 75 dias. Desses, 23 foram diagnosticados através da técnica de IHQ, utilizando SH. A outra metade dos participantes com amostras positivas apresentava tempo de evolução maior que 75 dias, e somente 14 foram diagnosticadas através da técnica de IHQ utilizando SH (Figura 9).

**Figura 9** – Associação dos resultados positivos, definidos por meio da técnica de IHQ, utilizando SH, e o tempo de evolução das lesões ( $\leq 75$  dias e  $>75$  dias)



**Fonte:** elaborado pelo autor

## 6. DISCUSSÃO

Considerando o arsenal diagnóstico limitado da LT e o potencial da técnica de IHQ, este trabalho avaliou o desempenho desta com o uso de anticorpos monoclonais comercialmente disponíveis e soros hiperimunes. Não foram encontrados anticorpos monoclonais produzidos, especificamente, contra antígenos das espécies de *Leishmania* dermatrópicas prevalentes no país (*L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*). Por isso, foram selecionados dois anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente no Brasil, produzidos a partir das espécies *L. donovani*/*L. infantum* e *L. major* (anti-*Leishmania* A2 e anti-*Leishmania* GP63, respectivamente).

A proteína recombinante A2 foi avaliada, através da técnica de ELISA, para o diagnóstico sorológico da LV canina e humana (COELHO et al., 2016; JUSI et al., 2015; CARVALHO et al., 2017). Porém, as análises realizadas em amostras humanas não apresentaram resultados satisfatórios, exigindo maiores estudos para aperfeiçoamento das técnicas, utilizando essa proteína (CARVALHO et al., 2017). No presente estudo, o anticorpo anti-*Leishmania* A2 também não apresentou um desempenho satisfatório, não sendo recomendado para o uso na técnica de IHQ para o diagnóstico da LT.

O outro anticorpo monoclonal comercial utilizado nesse estudo foi anti-*Leishmania* GP63. Duas lâminas apresentaram artefatos por processamento histológico ao realizar a técnica de IHQ utilizando esse anticorpo, com isso, as mesmas não entraram na análise estatística para esse anticorpo. Apesar da proteína GP63 ser descrita em diferentes espécies de *Leishmania* (MEDINA- ACOSTA et al., 1993), o desempenho da técnica de IHQ, empregando AcMo-GP63, foi muito baixo. Apenas um estudo foi encontrado avaliando o emprego da GP63 no diagnóstico de pacientes com LC. Foram utilizadas 33 amostras de pacientes infectados com *L. major*, avaliadas através da técnica de ELISA empregando antígeno purificado de GP63 de *L. donovani* e *L. major*. A sensibilidade encontrada foi maior para a GP63 de *L. donovani* (52%) comparada a GP63 de *L. major* (39%) (JENSEN et al, 1996). Em outro estudo, a amplificação do gene codificante para GP63 foi avaliado no diagnóstico molecular de cães infectados com *L. infantum*. Foram utilizadas 18 amostras de cães, com diagnóstico confirmado por exame parasitológico, e um

grupo controle de 45 amostras de cães de regiões não endêmicas para leishmaniose. A técnica de PCR, usando como alvo o gene codificante da GP63, apresentou bom desempenho, com sensibilidade de 85,3% e especificidade de 100% (GUERBOUJ et al., 2014).

Adicionalmente, dois soros hiperimunes foram incluídos nesse estudo. O primeiro soro foi produzido em coelho contra a proteína recombinante KMP-11. A proteína KMP-11, está presente tanto na forma amastigota como na forma promastigota de espécies de *Leishmania* e é descrita como um potencial marcador diagnóstico (JARDIM et al., 1995; BEBERICH et al., 1998). Passos e colaboradores (2005) utilizaram anticorpo anti-KMP-11 de *L. infantum* para diagnosticar pacientes com LV através do ensaio de ELISA e relataram uma sensibilidade de 100%. Apesar disso, no presente estudo, o soro hiperimune anti-KMP-11 apresentou baixo desempenho, ainda que na fase de padronização tenha apresentado reatividade em todas as lâminas (*L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*). O segundo soro hiperimune utilizado foi obtido de um *pool* de cães infectados com *L. infantum*. Este soro já foi utilizado em outros trabalhos que realizaram a padronização da técnica de IHQ, e apresentou resultados promissores para o diagnóstico da LT, com uma positividade de 91,8% em um primeiro estudo, e 70,5% em outro estudo com amostras multicêntricas (ALVES et al., 2013; MARQUES et al., 2017). No atual estudo, o mesmo soro hiperimune de cão apresentou o melhor desempenho (sensibilidade de 66,1%) dentre os anticorpos testados na técnica de IHQ.

Os critérios para determinar a positividade das amostras foram baseados em descrições da literatura. As *Leishmania* spp., na forma amastigota, mede de 2 a 4 µm de diâmetro, sendo necessária ampliação em objetiva de 100x e óleo de imersão, para visualização das mesmas. Os parasitos são encontrados no citoplasma de macrófagos, e caso sejam escassos, são achados, mais frequentemente logo abaixo da epiderme (EL-HASSAN, 1992; NORTON; FRANKENBURG, 1992; ul-BARI, 2006; SINGH & RAMESH, 2013). Entretanto, em duas amostras incluídas nesse estudo, os parasitos foram encontrados na derme profunda. Diante desse fato, ponderou-se a possibilidade de que o parasito encontrado fosse *L. amazonensis*. Para confirmar essa hipótese, foi realizada uma reação de PCR-RFLP para caracterização da espécie de *Leishmania* presente

nestas duas amostras. O resultado apresentou um padrão de restrição compatível com *L. braziliensis* (resultados não mostrados).

Alves e colaboradores (2013) compararam a técnica de IHQ utilizando duas diferentes alíquotas de anticorpo monoclonal anti-LPG, uma comercialmente disponível (Cedarlane Laboratories®, Burling, ON, Canadá) e outra produzida *in house* utilizando a técnica descrita por Tolson e colaboradores (1989), com um *pool* de soro de seis cães infectados com *L. infantum* (soro de cão hiperimune). A técnica de IHQ foi realizada utilizando amostras de pacientes provenientes de Caratinga/MG, que tiveram diagnóstico para LC confirmados por meio de exame clínico e parasitológico. Eles observaram que as diferentes alíquotas do anticorpo monoclonal anti-LPG apresentaram a mesma positividade (71,2%), utilizando o sistema de revelação de estreptavidina-peroxidase. Com a mesma técnica de revelação, utilizando o soro de cão hiperimune, a positividade foi de 91,8%. Além disso, a técnica de IHQ foi avaliada com outro sistema de revelação (polímeros livres de biotina), utilizando soro hiperimune de cão e apresentou a mesma positividade descrita acima. O sistema de revelação utilizando estreptoavidina-peroxidase é o mais empregado, porém produz coloração de fundo, gerada pela biotina endógena, o que não acontece utilizando sistema de polímeros livres de biotina. Além disso, o sistema de polímeros livres de biotina torna a técnica de IHQ mais rápida, e pode apresentar uma sensibilidade igual ou superior à técnica de IHQ, utilizando sistema estreptoavidina-peroxidase (RAMOS-VARA et al., 2008; ROCHA et al., 2009). Considerando que não há diferença nos dois sistemas de revelação e por ser mais rápido, neste trabalho, utilizamos o sistema de revelação de polímeros livres de biotina.

Marques e colaboradores (2017) também realizaram a técnica de IHQ com soro hiperimune de cão (ALVES et al, 2013), em amostras de pacientes com LT confirmada por PCR e caracterização do parasito por PCR-RFLP. As amostras foram provenientes de pacientes residentes em diferentes regiões endêmicas do Brasil (Pará, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Tocantins, Amazonas, Bahia e Maranhão), com uma variação de formas clínicas (LCL, LM e LCD) causadas por diferentes agentes etiológicos, que ao analisar o trabalho, supõe-se que sejam *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A positividade encontrada nesse estudo foi de 70,5%,

valor próximo ao encontrado nas nossas análises (70,8%) utilizando o mesmo soro hiperimune de cão (SH).

O anticorpo anti-*Leishmania* GP63 e o soro hiperimune de cão apresentaram reação cruzada com uma amostra de paciente infectado com *Sporothrix* spp. Esse resultado corrobora com os encontrados por Salinas e colaboradores (1989) e Quintella e colaboradores (2009), que descreveram a ocorrência de reação cruzada com fungos que causam a esporotricose, cromomicose, paracoccidiodomicose e histoplasmose. Salinas e colaboradores (1989) descreveram reação cruzada com uma amostra de biópsia de um paciente com paracoccidiodomicose, porém, segundo os autores, nesse caso foi possível diferenciar as características morfológicas do fungo com *Leishmania*. Os autores realizaram a técnica de IHQ utilizando soro hiperimune de coelho, a partir de promastigotas de *L. braziliensis panamensis* (HOM/COL/1981/Leish 13). Quintella e colaboradores (2009) utilizaram soro hiperimune obtido de coelhos albinos imunizados com quatro doses de extrato proteico solúvel de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/1974/PP75). Foram utilizados como controle 10 amostras de fragmento de pele, coletadas por biópsia, de pacientes com infecção fúngica, confirmada pelo isolamento do agente etiológico em cultura e/ou visualização na análise histopatológica: esporotricose, cromomicose, paracoccidiodomicose e histoplasmose. Como todas as formas fúngicas de todas as espécies estudadas no controle foram positivas, os autores destacaram a necessidade da análise morfológica cuidadosa da estrutura corada, e a correlação com técnicas histoquímicas específicas de fungos, que podem ser realizadas antes da IHQ. Ramos-Vara e colaboradores (2008) consideram dois tipos de reação cruzada (antígeno e espécies) em artigo publicado com sugestões de orientações para a realização da técnica de IHQ para diagnóstico laboratorial veterinário. A reação cruzada de antígeno pode ocorrer contra bactérias, fungos ou protozoários que são morfológicamente semelhantes ou que produzem lesões semelhantes. O exemplo citado por esses autores é que a *Leishmania* sp. pode apresentar reação cruzada com outros protozoários e fungos morfológicamente semelhantes, a exemplo do *Pneumocystis* sp., *Histoplasma* sp. e *Sporothrix* sp.



Ao comparar os resultados encontrados pela técnica de IHQ, utilizando soro hiperimune de cão, com os dos exames realizados no CRL/IRR/FIOCRUZ (exame direto e PCR), a concordância encontrada demonstra que a técnica de IHQ pode auxiliar no diagnóstico complementar da LT. Nem todas as amostras tinham resultado para o exame direto e poucas tinham resultado do microcultivo. Por isso, não foi realizada a concordância entre a técnica de IHQ e o microcultivo. Schubach e colaboradores (2001) compararam os resultados do exame histopatológico com os encontrados pela técnica de IHQ, utilizando soro anti-*Leishmania* obtido de coelhos imunizados com promastigotas de *Leishmania* isolada de paciente com LC, emulsionadas em adjuvante completo de Freund. Os autores ressaltaram a maior sensibilidade da técnica de IHQ, e a necessidade de associação de diferentes técnicas para o aumento da sensibilidade. Salinas e colaboradores (1989) discutiram a necessidade de combinação de ao menos duas técnicas diagnósticas para chegar a um diagnóstico definitivo, uma vez que nenhuma técnica utilizada conseguiu sozinha confirmar todos os casos de leishmaniose. Gomes e colaboradores (2014) mencionaram estratégias para combinar testes diagnósticos, devido à ausência de um teste padrão ouro para o diagnóstico da LT, sugerindo a utilização de análise em série, que geralmente é usado na combinação de mais de um teste.

Outro ponto importante para se observar nos resultados obtidos nesse estudo está relacionado à diferença de leitura entre os observadores. O “Observador 1”, com experiência técnica de patologista, definiu um maior número de amostras consideradas negativas, comparado ao do “Observador 2”, com visão de pesquisa/diagnóstico. A prática de pesquisa do “Observador 2”, com o hábito de procurar incessantemente as marcações na lâmina, resultou em um maior número de amostras positivas do que foi encontrada pelo “Observador 1”. Essa prática não é muito comum para quem trabalha na rotina como patologista, que possui uma estratégia prática para a análise das lâminas. Roy e Hunt (2010) publicaram uma revisão sobre detecção e classificação de discrepâncias diagnósticas em patologia cirúrgica, abordando os problemas que levam a um diagnóstico equivocado dado pelo profissional. Ter um patologista para revisar o material examinado é uma prática comum, principalmente porque existe um viés determinado pelos padrões de prática, treinamento, experiência, particularidades pessoais e erro humano (FOUCAR 1998; SIROTA, 2006). A IHQ pode estar sujeita a armadilhas de

reprodutibilidade decorrente da técnica, além de apresentar discrepância de leitura relacionada à falibilidade humana, mesmo que alguns observadores possuam mais experiência que outros (SIROTA, 2006).

Os participantes com tempo de evolução da lesão menor ou igual a 75 dias, apresentaram mais resultados positivos do que aqueles com tempo de evolução da lesão maior que 75 dias. Esse resultado pode ser explicado pela escassez de parasitos nas lesões com maior tempo de evolução. Alguns autores confirmaram, através da PCR em tempo real (qPCR), que a carga parasitária em lesões de pacientes diagnosticados com LC era inversamente proporcional ao tempo da lesão (JARA et al., 2013; PEREIRA et al., 2017). Pereira e colaboradores (2017), fizeram uma associação entre a carga parasitária em lesões de pacientes com apresentações clínicas causadas por *L. braziliensis* no Brasil e identificaram que o número de parasitos encontrados em lesões de pacientes com LM é mais baixo do que em pacientes diagnosticados com LC. Esse resultado corrobora com o encontrado no presente trabalho, que, apesar de usar somente duas amostras de pacientes diagnosticados com LM, ambas foram negativas na técnica de IHQ para todos os anticorpos e soros utilizados no estudo. Nesse estudo, dos oito participantes que apresentaram resultados positivos pela técnica de IHQ, utilizando soro SH--KMP-11, sete apresentavam tempo de evolução da lesão entre 40 e 90 dias, e um apresentava tempo de lesão de 365 dias, sendo que, esse participante também foi positivo utilizando o anticorpo anti-*Leishmania* A2. Outros dois participantes apresentaram resultado positivo na técnica de IHQ utilizando AcMo-A2, um com o tempo de evolução da lesão de 60 dias e outro com 90 dias. Onze participantes apresentaram resultados positivos pela técnica de IHQ, utilizando AcMo-GP63. Desses, seis apresentavam tempo de evolução da lesão entre 45 e 90 dias e os outros participantes tinham lesões com 180 a 365 dias de evolução.

## 7. CONCLUSÃO

A técnica de imuno-histoquímica é aplicável ao diagnóstico laboratorial da LT e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos para as espécies de *Leishmania*, predominantes no Brasil, contribuirá para o aumento da eficiência do diagnóstico laboratorial dessa doença negligenciada.

## 8. REFERÊNCIAS

- ALVES CF et al. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. **PLoS One.**, v.8, n. 5, p. e63343, 2013.
- ANDERS, G. et al. Distinguishing *Leishmania tropica* and *Leishmania major* in the Middle East using the polymerase chain reaction with kinetoplast DNA-specific primers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 96, n. 1, p. 87–92, 2002.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v.30, p.1269-1281, 2000.
- AVRAMEAS S. Enzyme markers: their linkage with proteins and use in immunohistochemistry. **Histochem J.**, v. 4, n. 4, p. 321-30, 1972.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B. et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.101, n.7, p. 735 – 737, 2007.
- AZEREDO-COUTINHO, R. B; MENDONÇA, S. C. F. Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas. In: Fátima Conceição-Silva; Carlos Roberto Alves. (Org.). *Leishmanioses do Continente Americano*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014, v. único, p. 311-326.
- BARBOSA, A. J. A. As Técnicas de Imunoperoxidase no Estudo da Etiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.21, p.1-6, 1988.
- BASANO, S. A., CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 328 -337, 2004.
- BENSOUSSAN E, et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol.**, v. 44, n. 4, p.1435-9, 2006.
- BERBERICH, C. et al. The expression of the *Leishmania infantum* KMP-11 protein is developmentally regulated and stage specific. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1442, n.2-3, p. 230-7, 1998.
- BIANCHINI G. et al. Molecular dynamics simulation of *Leishmania major* surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). **Proteins.**, v. 64, n. 2, p. 385-90, 2006.
- BOGGILD, A. K. et al. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. **Am J Trop Med Hyg**, v.79, n.6, p. 847–52, 2008.
- BORST, P., HOEIJMAKERS, J. H. J. Kinetoplast DNA - Review. **Plasmid**, New York, n.2, p. 20-40, 1979.

BOTELHO, A.C.C. et al. Histopathology of human american cutaneous leishmaniasis before and after treatment. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.31, p.11-18, 1998

BRASIL, 2018. **SINAN**. Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>

Acesso em: 17/01/2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância epidemiológica. 6ª ed. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, p. 444-466, 2005.

Disponível em:

[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_guia\\_bols.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_guia_bols.pdf).

Acesso em: 12/12/2018

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, 2017.

BRASIL. DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. 2015

Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br>.

Acesso em: 12/01/2019

BRYCESON, A. D. M. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histopatological feature of the disease. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 63, p. 708-737, 1969.

CARVALHO, E.M. et al. Cell-mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 6, p.4144-4148, 1985.

CARVALHO, F.A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **DM and Infec Disease** v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.

CARVALHO A. M. R. S. et al. An ELISA immunoassay employing a conserved *Leishmania* hypothetical protein for the serodiagnosis of visceral and tegumentary leishmaniasis in dogs and humans. **Cell Immunol.**, v. 318, p.42-48, 2017.

CASTÉS, M. et al. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Immun and Immunopathology**, v. 27, n.2, p.176-186, 1983.

CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental Gene Expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage- specific gene. **Molecular And Cellular Biology**, v. 14, n. 5, p. 2975–2984, 1994.

COELHO, E. A. et al. Immune responses induced by the *Leishmania (Leishmania) donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against

experimental *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Infection and immunity**, v.71, n. 7, p.3988-3994, 2003.

COELHO, E. A. et al. Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, v. 15, n. 215, p. 63-71, 2016.

COHEN J. A coefficient of agreement for nominal scales. **Educ Psychol Meas.** V. 20, p. 37–46, 1960.

CONVIT, J. et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 87, n. 4, p. 444-448, 1993.

CRUZ, I. et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. **Exp Parasitol**, v. 134, n.3, p.281–289, 2013.

CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, J. G. Genetic diversity among *Leishmania (Viannia)* parasites. **Annals Trop Med and Paragy**, v. 9, p. 617-26, 1997.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther**, vol. 22, n.6, p. 491 – 502, 2009.

DE MELLO, C. X. et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 109, n. 3, p. 927-33, 2011.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-18, 2004.

DESJEUX P. Leishmaniasis: public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v.14, p.417- 423, 1996.

DESTOMBES, P. Application du concept de systematization polaire aux leishmanioses cutanées. **Bull. Soc. Pat. Exot.**, v. 53, p.299, 1960.

DINHOPL, N. et al. In situ hybridisation for the detection of *Leishmania* species in paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. **Vet Rec.** v.169, p.525, 2011.

DISCH J. et al. Detection of circulating *Leishmania chagasi* DNA for the non-invasive diagnosis of human infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 97, n. 4, p. 391-5, 2003.

DISCH, J. et al. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v. 51, n.3, p. 185-190, 2005.

DURAIYAN, J. et al. Applications of immunohistochemistry. **J Pharm Bioallied**, v. 4, n. 6, p. 307-309,2012.

EL HASSAN. et al. Post kala azar dermal leishmaniasis in the Sudan-clinical features pathology and treatment. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 86, p. 245-8, 1992.

FOUCAR, E. Error identification: a surgical pathology dilemma. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 22, p. 1-5, 1998.

FURTADO, M. C. et al. Comparative study of in situ hybridization, immunohistochemistry and parasitological culture for the diagnosis of canine leishmaniasis. **Parasit Vectors.** v.8, p.620, 2015.

FURTADO, T. Critérios para diagnóstico de LTA. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.65, p.51-86, 1980.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **An Bras Dermatol.**, v. 89, n. 5, p.701-11, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 1, p.71-80, 2003.

GOSCH, C. S. et al. American tegumentary leishmaniasis: epidemiological and molecular characterization of prevalent *Leishmania* species in the State of Tocantins, Brazil, 2011-2015. **Rev Inst Med Trop**, v.59, n .91, p. 1-11 2017.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.8, n.4, p. 419–33, 2010.

GUERBOUJ, S. et al. Evaluation of a gp63–PCR Based Assay as a Molecular Diagnosis Tool in Canine Leishmaniasis in Tunisia. **Plos One**, v. 9, n. 8., p. e105419, 2014.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 73, n. 6, p. 897-908, 2015.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet.** v. 354, n. 9185, p.1191-9, 1999.

HSIAO C. H. et al. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania* chagasi. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 157, n. 2, p. 148-59 2008.

Instituto René Rachou. Leishmaniose tegumentar: Relatório 2 / Estudos Estratégicos para Inovação e desenvolvimento tecnológico em diagnóstico e terapêutica de doenças negligenciadas (Org.). – Belo Horizonte: **Instituto René Rachou, 2018.**  
Disponível em: <http://prioridadesdnts.minas.fiocruz.br/>  
Acessado em: 17/01/2019

JARA, M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (*Viannia*) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **J Clin Microbiol**, v. 51, p. 1826-1833, 2013.

JARDIM, A. et al. Cloning and structure-function analysis of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11. **Biochem J.** 1995 v. 305, p. 315-20.

JENSEN, ATR., et al. Serodiagnosis fo cutaneous leishmaniasis: Assessment of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using a peptide sequence from Gene B protein. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 55, n. 5, p. 440-5, 1996.

JUSI, M. M. et al. Expression of a recombinant protein, A2 family, from *Leishmania infantum* (Jaboticabal strain) and its evaluation in Canine Visceral Leishmaniasis serological test. **Rev Bras Parasitol Vet.**, v. 24, n. 3, p. 309-16, 2015.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit Rev Microbiol**, v.21, n.2, p.123–52, 1995.

KAUR T, SOBTI RC, KAUR S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **Parasite Immunol.**, v. 33, n. 2, p. 95-103, 2011.

KASSI, M. et al. Fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Ann Saudi Med**, v. 24, n. 2, p.93–97, 2004.

KEMPF, V. A.; TREBESIUS, K.; AUTENRIETH; I. B. Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. **J Clin Microbiol.** v.38, p. 830-8. 2000.

KENNER, J. R. et al. Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **J Cutan Pathol**, v.26, n.3, p.130-136, 1999.

LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine. **Biology and epidemiology. Academic Press: London**, v. 1, p. 1- 120, 1987.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev. Pan-Amaz. de Saúde**, v.1, n.2, 2010.

LANDIS, J. R., KOCH, G. G. The measurements of agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LIMA JUNIOR, M. S. et al. Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul by means of polymerase chain reaction. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 3, p. 303-308, 2009.

LIVNI, N. et al. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v.401, n.2, p.147-51, 1983.

LUCOCQ, J. M.; ROTH, J. Colloidal gold and colloidal silvermetallic markers for light microscopic histochemistry. In: Immunocytochemistry, eds. **Bullock GR and Petrusz**, p. 203-236, 1985.



LUZ Z. M. et al. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2009 v. 104, n. 1, p. 62-6, 2009.

LYNCH, N. R. et al. In situ detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis, using monoclonal antibodies. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.80, n.1, p. 6-9, 1986.

MAGALHÃES, A. V. et al. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Rev Inst Med Trop**, v.28, n.4, p.253-262, 1986.

MAGILL, A. J. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. **Infect Dis Clin North Am**, v.19, v.1, p. 241–266, 2005.

MARFURT, J et al. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. **J Clin Microbiol**, v.41, n.7, p.3147-3153, 2003.

MARQUES F. A. et al. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasitol Int.**, v. 66, n. 1, p. 884-888, 2017.

MARTINS, A.L.G.P.; BARRETO, J.A.; LAURIS, J.R.P. American tegumentar leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.89, n.1, p.52-58, 2014.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J B M**, v.63, p.82-104, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cad Saúde Pública**, v.10, n.2, p.359-375, 1994.

MEDEIROS, A. C.; RODRIGUES, S. S.; ROSELINO, A. M. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v.35, p. 421-424, 2002.

MEDINA-ACOSTA, E. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple 'mini-prep' procedure. **Molec and Biochem Parasit.**, v. 59, p.327–330, 1993.

MENEZES, R. C. et al. Sensitivity and specificity of in situ hybridization for diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. **J Clin Microbiol**. v. 51, p. 206-11, 2013

MIGHELL, A.J.; HUME, W.J.; ROBINSON, P.A. An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. **Oral Diseases**, v.4, p. 217-223, 1998.

MILLER D. D. et al. Acute New World cutaneous leishmaniasis presenting as tuberculoid granulomatous dermatitis. **J Cutan Pathol.**, v. 39, n. 3, p. 361-5, 2012.

MITROPOULOS P, KONIDAS P, DURKIN-KONIDAS M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol.**, v. 63, n. 2, p. 309-22, 2010.

MONTENEGRO, J. A cutis-reação na leishmaniose. In: **Anais da Faculdade de Medicina de São Paulo**, n.1, p. 323-330, 1926.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

MUSSO, O, et al. In situ detection of human cytomegalovirus DNA in gastrointestinal biopsies from AIDS patients by means of various PCR derived methods. **J Virol Methods**, v.56, n. 2, p.125–137, 1996.

NAIFF, R. D. A scarifier for obtaining specimens for diagnosis of leishmaniasis and other skin infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 92, n.1, p.87, 1997.

NAKANE, P. K. & PIERCE, G. B. (1967). Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. **Cell Biol.**, v. 33, p. 307-18.

NEGRÃO, G. N., FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas américas. **Rev. Percurso**, v. 1, n. 1, p. 85-103, 2009.

NICOLIS, G. D. et al. Clinical and histopatological study of cutaneous leishmaniasis. **Acta Derm. Venereal.**, v. 58, p 521-526, 1978.

NORTON, S. A., FRANKENBURG, S. Cutaneous Leishmaniasis Acquired During Military Service in the Middle East. **Arch Dermatol.**, v. 128, 1992.

OLIVEIRA, Diana Souza de. Aplicabilidade de testes sorológicos para diagnóstico da forma mucosa da leishmaniose tegumentar. 2018. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2018.

OPAS/OMS. Informe Epidemiológico das Américas.

Disponível em:

[http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6\\_por.pdf;jsessionid=9110DB75E4F43A1FA7BCD93A4497CD79?sequence=5](http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf;jsessionid=9110DB75E4F43A1FA7BCD93A4497CD79?sequence=5)

Acesso em: 22/12/2018

PASSOS, L. P et al. Recombinant Leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin. And Diag. Lab. Immunon.**, v.12, n. 10, 2005.

PEREIRA, L. O. R. et al. Is Leishmania (Viannia) braziliensis parasite load associated with disease pathogenesis? **Int J Infect Dis.**, v. 57, p. 132-137, 2017

PERSING, D. H. et al. Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. Washington: **American Society for Microbiology**, p. 641. 1993.

POLAK, J. M., VAN NOORDEN, S. Introduction to immunocytochemistry. **Bios Scientific Publishers Ltd**, 2003.

QUINTELLA, L. P. et al. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Rev Inst Med Trop**, São Paulo, v.51, n.2, p.83-86, 2009.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Vet, Path.**, v. 42, p. 405-426, 2005.

RAMOS-VARA, J. A. et al. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. **J Vet Diagn Invest**, v.20, p.393-413, 2008.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v.7, n. 9, p. 581-96, 2007.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J Clin Microbiol.** v.45, p.21-5, 2007.

RIDLEY, D.S. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, p. 150-160, 1979.

RIDLEY, D.S. et al. A Histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.74, p.508-514, 1980.

RIDLEY, D. S & RIDLEY, M. J. Late-stage cutaneous leishmaniasis: immunopathology of tuberculoid lesion in skin and lymph nodes. **Brit. J. exp. Path.**, v. 65, p. 337-346, 1984.

ROCHA, R. M. et al. The use of the immunohistochemical biotin-free visualization systems for estrogen receptor evaluation of breast câncer. **Applied Cancer Research**, v.29, n.3, p.112-117, 2009.

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v. 28, p. 1401, 1903.

ROY, J. E.; HUNT, J. L. Detection and classification of diagnostic discrepancies (errors) in surgical pathology. **Adv. Anat. Pathol.**, v.17, n. 5, 2010.

RYAN, J. R, et al. Enzyme-linked immunosorbent based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol.**, v.40, n.3, p. 1037-1043, 2002.

SAHOO, G. C. et al. Structural modeling, evolution and ligand interaction of KMP11 protein of different *Leishmania* strains. **J. Comput. Sci. Syst. Biol.** v.2, p.147-158, 2009.

SALINAS, G. et al. Detección de amastigotas en leishmaniasis cutanea y mucocutanea por el metodo de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con metodos convencionales de diagnostico. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.84, p.53-60, 1989.

SALMAN, S., RUBEIZ, N. G., KIBBI, A. G., Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clin Dermatol**, v.17, p.291-296, 1999.

SANNIGRAHI, A. et al. Interaction of KMP-11 with Phospholipid Membranes and Its Implications in Leishmaniasis: Effects of Single Tryptophan Mutations and Cholesterol. **J Phys Chem B**, v.121, n. 8, p. 1824-1834,2017.

SARAVIA NG, et al. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. **J Infect Dis.**, v. 159, n. 4, p. 725-35, 1989.

SCHUBACH, A. et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of american tegumentary leishmaniasis patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, 987-996, 2001.

SELLS, P. G.; BURTON, M. Identification of *Leishmania* amastigotes and their antigens in formalin fixed tissue by immunoperoxidase staining. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v.75, p.461-468, 1981.

SHARMA, S. et al. A small molecule chemical chaperone optimizes its unfolded state contraction and denaturant like properties. **Sci. Rep**, v.3, n. 3525, p. 1-9, 2013.

SHAW, J. J.; LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 69, n. 3, p. 323-335, 1975.

SHIRIAN, S. et al. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 138, 2014.

SILVEIRA, F. T., LAINSON, R., CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with especial reference to the disease in amazonian brazil – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p.239-251, 2004.

SINGH, B. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v.27, p.1135-1145, 1997.

SINGH, S., SIVAKUMAR, R. Recent Advances in the Diagnosis of Leishmaniasis. **J Postgrad Med**, v.49, n.1, p.55-60, 2003.

SINGH, A.; RAMESH, V. Histopathological features in leprosy, post-kala-azar dermal leishmaniasis, and cutaneous leishmaniasis. **Symp. Dermat.**, v. 79, n. 3, p. 360-366, 2013.

SIROTA, R. L. Defining error in anatomic pathology. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 130, p. 604-606, 2006.

SOLOMON M, et al. Unusual forms of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, v. 30, n. 7, p. 1171-5, 2016.

SOTTO M. N. et al. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Trop.**, v. 46, n. 2, p. 121-30, 1989.

STEBECK C. E. et al. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 71, n. 1, p. 1-13, 1995.

STRAZZULLA A, et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **Biomed Res Int.**, p. 805108, 2013.

TAVARES, C. A., FERNANDES, A. P., MELO, M. N. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn**, v. 3, n. 5, p. 657–667, 2003.

TAYLOR, C. R.; SHI, S.R.; BARR, N.J. **Techniques of immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization**. Diagnostic Immunohistochemistry. 4 ed., Elsevier, 2002.

TESSAROLLO, N. G. Análise funcional dos genes da enzima ferro superóxido dismutase-a e da proteína de membrana dos kinetoplastídeos-11 em linhagens de *Leishmania* selvagens e resistentes ao antimônio trivalente. Dissertação (mestrado) – Instituto René Rachou/ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2013.

TURK, J. L., BRYCESON, D. M. Immunological Phenomena in Leprosy and Related Diseases. **Adv. Immuno.**, v. 13, p. 209-266, 1971.

ul BARI, A.; ber RAHMAN, S. Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 7, 2006.

VAN DER MEIDE, W. F. et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. **J Clin Microbiol**, v.43, n.11, p.5560-5566, 2005.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

VRIES, H. J.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 16, n. 2, p. 99-109, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Unveiling the neglect of leishmaniasis infographic. 2015  
Disponível em:

[http://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling\\_the\\_neglect\\_of\\_leishmaniasis\\_infographic.pdf?ua=1](http://www.who.int/leishmaniasis/Unveiling_the_neglect_of_leishmaniasis_infographic.pdf?ua=1).

Acesso em: 30/10/2017.

ZHANG, W.; MATLASHEWSKI, G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 935–948, 2001.

## APÊNDICE 1 – Dados clínicos dos participantes do estudo

Paciente	Número de lesões	Tempo de evolução em dias	Localização	Forma Clínica	Tipo de lesão	Diagnóstico final
1	2	60	MMSS/Tronco	Cutânea	Úlcera	LT
2	1	540	Cabeça	Mucosa	Infiltração	LT
3	1	45	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
4	1	60	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
5	1	50	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
6	1	150	MMSS	Cutânea	Úlcera	Esporotricose
7	3	75	Tronco/MMSS	Cutânea	Placa e Úlcera	LT
8	1	60	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
9	1	60	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
10	1	120	MMSS	Cutânea	Úlcera	Câncer
11	2	35	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
12	1	160	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
13	1	240	MMSS	Cutânea	Úlcera	Esporotricose
14	1	50	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
15	1	90	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
16	1	45	MMSS	Cutânea	Úlcera	Esporotricose
17	3	240	MMII	Cutânea	Úlcera	Úlcera de estase
18	1	180	MMII	Cutânea	Úlcera	Câncer
19	1	50	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
20	1	90	Cabeça	Mucosa	Úlcera	Candidíase
21	1	60	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
22	1	40	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
23	1	30	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
24	1	90	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
25	1	45	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
26	1	90	MMSS	Cutânea	Úlcera	Esporotricose
27	1	90	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
28	2	30	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
29	1	60	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
30	2	60	MMSS/Cabeça	Cutânea	Úlcera e Nódulo	LT
31	1	40	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
32	1	240	Cabeça	Mucosa	Úlcera	LT
33	1	300	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
34	1	90	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
35	2	60	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
36	2	365	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
37	1	120	MMII	Cutânea	Úlcera	Câncer
38	1	60	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
39	1	60	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
40	1	90	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
41	1	90	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT

Paciente	Número de lesões	Tempo de evolução (dias)	Localização	Forma Clínica	Tipo de lesão	Diagnóstico final
42	1	90	Cabeça	Mucosa	Úlcera	Câncer
43	1	150	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>LT</b>
44	3	365	Cabeça/Tronco	Cutânea	Placa e Nódulo	LT
45	5	45	<b>MMSS/Tronco</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>LT</b>
46	1	70	Cabeça	Cutânea	Úlcera	LT
47	2	40	<b>Cabeça</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>LT</b>
48	1	180	Cabeça	Cutânea	Úlcera	Câncer
49	1	40	<b>MMSS</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>LT</b>
50	4	90	MMSS/Tronco/Cabeça	Cutânea	Úlcera e Placa	LT
51	2	730	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>Dermatite</b>
52	1	90	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
53	1	210	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>LT</b>
54	1	60	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
55	1	60	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Placa</b>	<b>Dermatite</b>
56	1	180	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
57	1	90	Tronco	Cutânea	Úlcera	LT
58	1	300	MMII	Cutânea	Úlcera	Úlcera de estase
59	3	60	Tronco	Cutânea	Úlcera	LT
60	1	90	MMSS	Cutânea	Úlcera	LT
61	1	150	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>LT</b>
62	1	150	Cabeça	Cutânea	Úlcera	Câncer
63	2	120	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>LT</b>
64	5	90	MMSS/Cabeça/Tronco	Cutânea	Úlcera	LT
65	2	150	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Úlcera</b>	<b>Úlcera de estase</b>
66	1	120	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
67	1	180	<b>MMII</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Placa</b>	<b>LT</b>
68	1	120	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
69	1	150	Tronco	Cutânea	Úlcera	LT
70	1	60	MMII	Cutânea	Úlcera	LT
71	3	150	<b>MMSS/Tronco</b>	<b>Cutânea</b>	<b>Placa</b>	<b>LT</b>
72	1	90	MMII	Cutânea	Úlcera	LT



## ANEXO 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisas do Instituto René Rachou

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

**Pesquisador:** MARCELO PASCOAL

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 56188716.5.0000.5091

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPQRR/

**Patrocinador Principal:** Centro de Referência em Leishmanioses

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.598.850

#### Apresentação do Projeto:

O projeto propõe o estudo descritivo, observacional e transversal, do tipo piloto ou de prova de conceito do emprego da técnica imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais anti-Leishmania para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. Para tal, propõe a utilização de biópsias de pele ou mucosa de pacientes obtidas durante o procedimento de rotina para o diagnóstico de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar, cutânea ou mucosa, atendidos no Centro de Referência em Leishmanioses (CRL) – CPQRR/FIOCRUZ, no período entre 01/08/2016 e 31/07/2018. Por se tratar de estudo descritivo ou de prova de conceito, não há necessidade de cálculo amostral. Entretanto, para maior significância estatística, o estudo prevê a participação de, no mínimo, 30 pacientes distribuídos entre casos (mínimo de 20 pacientes) e controles (mínimo de 10 pacientes).

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral do projeto é otimizar o uso de anticorpos monoclonais para o diagnóstico imuno-histoquímico de leishmaniose tegumentar. Assim sendo os objetivos específicos são: a) Selecionar anticorpos monoclonais com potencial aplicação na IHQ, por meio da busca em base de dados e depósitos patentários; (b) Obter anticorpos monoclonais da classe IgG, produzidos em camundongos, contra espécies dos subgêneros Leishmania ou Viannia; (c) Otimizar os anticorpos monoclonais não-conjugados para o uso em imuno-histoquímica; (d) Padronizar as etapas de

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.588.850

diluição, recuperação antigênica, reação e detecção dos anticorpos monoclonais dos ensaios de imunohistoquímica; (e) Comparar os resultados do diagnóstico imunohistoquímico com os métodos parasitológicos (imprint e aspirado), histopatológico e moleculares.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A descrição dos riscos e benefícios descritos no projeto em questão estão adequados não sendo necessárias quaisquer modificações e adendos, tendo em vista que serão utilizadas as mesmas amostras coletadas para o diagnóstico de rotina dos pacientes com suspeita de leishmaniose.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Caso seja desenvolvida a metodologia para o diagnóstico da leishmaniose aqui proposta, certamente este projeto contribuirá enormemente para o diagnóstico da doença.

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

Os termos de apresentação obrigatória estão adequados.

**Recomendações:**

Não se aplica.

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

O projeto em questão deve ser aprovado sem modificações. É assim como opinamos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após submissão e análise do protocolo em questão, constatamos que o estudo atende aos aspectos fundamentais da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Diante do exposto, o Comitê de Ética do CPQRR/FIOCRUZ Minas, de acordo com as atribuições a ele concedidas pela Legislação vigente, manifesta-se pela aprovação deste Estudo. Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios anual e final, bem como a notificação de eventos adversos, de emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_686995.pdf	28/03/2016 17:09:55		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Protocolo.pdf	28/03/2016 17:09:10	MARCELO PASCOAL	Aceito

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/**



Continuação do Parecer: 1.588.850

Folha de Rosto	FolhaDeRostoassinada.pdf	28/03/2016 17:07:26	MARCELO PASCOAL	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/03/2016 16:15:25	MARCELO PASCOAL	Acelto
Declaração do Patrocinador	DeclaracaoCRL.pdf	28/03/2016 16:15:12	MARCELO PASCOAL	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoCPQRR.pdf	28/03/2016 16:14:58	MARCELO PASCOAL	Acelto
Orçamento	Orcamento.pdf	28/03/2016 16:13:59	MARCELO PASCOAL	Acelto
Cronograma	Cronograma.pdf	28/03/2016 16:13:10	MARCELO PASCOAL	Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 20 de Junho de 2016

\_\_\_\_\_  
Assinado por:  
**Laiza Daniele Nunes de Assumpção**  
(Coordenador)

Endereço: Avenida Augusto de Lima, 1715  
Bairro: Barro Preto CEP: 30.190-002  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3349-7825 Fax: (31)3349-7825 E-mail: cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br