

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto René Rachou**  
**Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva**

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR COM ACOMETIMENTO MUCOSO:  
ESPECTRO CLÍNICO E ACURÁCIA DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS**

**por**  
**Mariana Junqueira Pedras**

**Belo Horizonte**  
**2021**

**TESE**

**DSC - IRR**

**M. J. PEDRAS**

**2021**

**MARIANA JUNQUEIRA PEDRAS**

**LEISHMANIOSE TEGUMENTAR COM ACOMETIMENTO MUCOSO:  
ESPECTRO CLÍNICO E ACURÁCIA DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS**

Tese apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Saúde Coletiva do  
Instituto René Rachou como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutor  
em Saúde Coletiva – área de  
concentração Saúde Coletiva

Orientadora: Gláucia Fernandes Cota

Coorientadora: Ana Lúcia Teles Rabello

Belo Horizonte

2021

O presente trabalho foi realizado com apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) - Código de Financiamento 001.

P372I Pedras, Mariana Junqueira.  
2021

Leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso: espectro clínico e acurácia dos métodos diagnósticos / Mariana Junqueira Pedras. - Belo Horizonte, 2021.

161 f. : il. color.

Orientadora: Glaucia Fernandes Cota.

Coorientadora: Ana Lúcia Teles Rabello

Tese (Doutorado Acadêmico em Saúde Coletiva), Belo Horizonte, 2021.

Bibliografia: f. 132 - 141.

1. Leishmaniose Mucocutânea/diagnóstico. 2. Leishmaniose Mucocutânea/epidemiologia. 3. Leishmaniose Mucocutânea/mortalidade. I. Título.

CDD 616.936 4

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica:  
Segemar Oliveira Magalhães – CRB/6 1975 FIOCRUZ. Instituto René Rachou.  
Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener

NOME DO ALUNO: MARIANA JUNQUEIRA PEDRAS  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR COM ACOMETIMENTO MUCOSO: ESPECTRO  
CLÍNICO E ACURÁCIA DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva do Instituto René Rachou, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Saúde Coletiva – área de concentração Saúde Coletiva.

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gláucia Fernandes Cota (IRR/Fiocruz Minas) Presidente

Prof. Dr. Valdir Sabbaga Amato (FMUSP) Titular

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Hueb (UFMT) Titular

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Fagundes da Silva (INI/Fiocruz) Titular

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Utsh Gonçalves (UFMG) Titular

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paloma Helena Fernandes Shimabukuro (IRR/Fiocruz Minas) Suplente

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 19/11/2021

“Uma sociedade marcada por profundas desigualdades como a nossa não pode gerar felicidade coletiva. Desigualdade significa injustiça social, acumulação de riqueza por poucos e à custa da espoliação das maiorias. A pretensa felicidade dos opulentos não pode se sustentar a preço da infelicidade das maiorias.”

Leonardo Boff

## Dedicatória

Vovô José Vilella Pedras, (Fiocruz 1930), Mariana (Fiocruz 2021): sigo seus passos!

Mamãe e papai, para vocês, com todo meu amor. Aprendi que estudar é o caminho.  
Tia Madalena, que sentiu mais orgulho dessa conquista que eu mesma.

Ana Luiza e Rafael, por vocês e para vocês sempre! Minhas vidas.

## AGRADECIMENTOS

Início pedindo desculpas ao leitor. A lista é grande, precisa ser grande e quero que seja grande. Afinal, são 23 anos de René Rachou. E os últimos quatro estão diretamente interligados nesta caminhada.

Ana, tudo que sei devo a você! Minha história de IRR foi guiada e orientada pelos seus ensinamentos, conselhos, ajuda e exemplo. Agradeço ao Reginaldo Brasil, que me encaminhou até seu laboratório. Tive muita sorte! Ganhei uma “chefe” exemplar e muito querida, uma amiga para sempre e uma vizinha especial.

Gláucia, você me “herdou” sem escolha, mas me aceitou de braços abertos e com muitos ensinamentos valiosos. Com carinho, cuidado e paciência aceitou meus atrasos, resolveu minhas dúvidas e me acalmou nos momentos difíceis. Tive muita sorte, de novo! Estou esperando o workshop de como ser 1000 em 1 com toda excelência, competência e agilidade. Exemplo a ser seguido!

Roberto, diretor querido, fiquei muito feliz em terminar esse trabalho na sua gestão. E, claro, também feliz por ter iniciado na gestão da Zélia. Importantes incentivadores.

Pós-graduação em Saúde Coletiva, principalmente os professores, vocês me ensinaram a enxergar bem mais além, onde deveria ser o foco de toda a humanidade.

Patrícia e Eliza, a secretaria da pós em Saúde Coletiva é brilhante, graças a vocês.

Denise Utsch, sempre de portas abertas para todos os pacientes.

Eduardo, Mariana e Amanda, a disponibilidade da equipe do COLTEC me trouxe tranquilidade e alegria nessa jornada.

Pri, Gleizi, Ana, Lara, Sarah, Hugo e toda equipe amiga do CRL. Receber os pacientes com respeito, atenção e carinho é nosso lema! Vocês foram fundamentais nessa conquista.

Rosi, minha amiga! É o “HD externo” mais confiável do CRL. Como sua presença nessa história deixou tudo mais leve e tranquilo.

Jana, um ombro amigo vale mais que um psicólogo! E te devo até a eternidade pela ajuda com o Zotero.

Daniel, fundamental para o equilíbrio “da turma”. Tranquilidade e disposição acima de tudo. Paciência e ajuda, sempre, diante de tantas dúvidas com a biologia molecular.

Eliane e Tália, nossa caminhada já é longa. Sempre com muita parceria, troca de experiências e muitos momentos felizes.

Verônica e Iara, minhas companheiras no estudo das formas mucosa da leishmaniose. Formamos uma bela equipe!

Mari Freire, a dona da imuno-histoquímica! Sempre disposta e sorridente para me ajudar

Líndicy, Carol, Dian e Arthur, um por todos e todos por um. Não temos tempo ruim, não temos cara fechada. Companheirismo e amizade, sempre!

Equipe da Gestão do IRR, em nome da vice-diretora Ivanete, amiga especial que o concurso me aproximou. Nossos estudos só são possíveis pelo suporte que recebemos.

Ana Luiza e Rafael, minha vida! Lulu, meu amor. Esses últimos meses não foram fáceis. Mas juntos somos mais!

Papai e mamãe, vocês são meu Norte, minha fortaleza sempre!

Ana Lucia, Dri, Alice e Tomás; José, Stael e Sophia, vocês fazem parte dessa história. O Recanto estará sempre aberto, é só chegar!

E, para fechar com chave ouro, pacientes do ambulatório Alda Lima Falcão, sem vocês esse trabalho não seria possível.

A todos meu mais carinhoso e sincero MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

A leishmaniose com acometimento mucoso é a forma mais negligenciada das leishmanioses. No Brasil, a forma mucosa corresponde a cerca de 6% do total de casos de leishmaniose tegumentar (LT) notificados. Entretanto, faltam critérios bem definidos para a classificação da leishmaniose nas variações das formas cutânea e mucosa, o que pode gerar imprecisão nos dados de morbidade da doença. Em relação à condição propriamente dita, o comprometimento mucoso impõe desafios adicionais ao diagnóstico da leishmaniose, seja pela dificuldade de acesso às superfícies mucosas, seja pela escassez de parasitos nestes locais. Nesse contexto, esse estudo se propõe a identificar aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais e evolutivos capazes de distinguir as diferentes apresentações clínicas observadas para leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso, bem como descrever a acurácia para seu diagnóstico de um novo anticorpo monoclonal para imuno-histoquímica, duas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (sistemas de detecção SYBER para alvo kDNA e sistema de detecção TaqMan para o alvo SSU rRNA) e uma técnica de PCR convencional para o alvo hsp70, além de cinco testes sorológicos em plataforma de imunoensaio. No ambulatório Alda Lima Falcão do Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto René Rachou, entre abril de 2017 e setembro de 2020, foram recrutados 124 pacientes com alterações mucosas e suspeita de leishmaniose, sendo 100 deles confirmados com a doença pelo critério parasitológico ou molecular. Os pacientes foram reunidos em subgrupos com diferentes apresentações clínicas de acordo com a presença, localização e número de lesões de pele concomitantes à lesão mucosa, o que permitiu a identificação de suas especificidades. De interesse, pacientes com lesão mucosa exclusiva exibiam maior tempo de evolução da doença (12 meses) em relação àqueles com lesão mucosa associada a lesões de pele à distância (8 meses) ( $p=0,004$ ), que por sua vez, exibiam maior taxa de acometimento da cavidade oral (44,2% vs. 20%) ( $p=0,011$ ) e de positividade ao exame imuno-histoquímico (53% vs. 41%) ( $p=0,009$ ). No subgrupo de pacientes com lesões de pele não contíguas à mucosa, identificou-se menor tempo de doença (3 vs. 11 meses daqueles com lesões de pele contíguas à mucosa) ( $p=0,002$ ), mediana de 4 lesões de pele por paciente, predominantemente úlceras (90%). Observou-se ainda que pacientes com comprometimento mucoso com mais de seis lesões cutâneas (definição operacional de forma disseminada) eram significativamente mais jovens (44 vs. 62 anos) que aqueles com menos de seis lesões de pele ( $p=0,024$ ). Pacientes com leishmaniose mucosa

acometendo estritamente a topografia do nariz, ou seja, mucosa com ou sem o acometimento da pele adjacente, apresentavam tempo de evolução da doença significativamente maior (12 meses) em relação aos pacientes com doença não restrita ao nariz (8 meses) ( $p=0,002$ ), que apresentaram maior taxa de reatividade ao ELISA *in house* baseado em extrato de *L. braziliensis* (92,7% vs. 72,4%) ( $p=0,018$ ). Já aqueles pacientes com acometimento mucoso restrito às vias aero digestivas altas, com ou sem lesões de pele contíguas, apresentaram maior percentual de falha terapêutica no seguimento de seis meses (16,7% vs. 3,5%) ( $p=0,025$ ), em relação aos pacientes com outras apresentações clínicas. Em relação à acurácia diagnóstica dos testes, em avaliação incluindo todos os pacientes independentemente da apresentação clínica, observamos as maiores sensibilidades para os testes de PCR em tempo real (94,2% para qPCR/Syber e 87% para qPCR/TaqMan), ambos com especificidade em torno de 85%, sem diferença estatística entre eles. Entre os imunoenaios, sensibilidade moderada foi observada para dois testes: 71,7% para ELISA *in house* baseado em antígeno de *L. braziliensis* e 62,3% para ELISA comercial baseado em antígenos de *L. infantum*, sem diferença estatística entre eles. A sensibilidade da imuno-histoquímica foi de 45%, com especificidade de 90%. Em síntese, nossos resultados confirmam a existência de apresentações distintas para a leishmaniose com comprometimento mucoso, sendo a forma restrita ao nariz ou vias aéreo digestivas, com ou sem acometimento da pele adjacente, característica de pacientes mais velhos, com tempo de evolução de doença maior e tipicamente com lesões de pele do tipo infiltrativo, grupo esse que tem menor probabilidade de cura aos seis meses de seguimento. Pacientes com lesões de pele distantes do local de acometimento mucoso exibiram maior proporção de lesões de pele do tipo ulcerado e maior probabilidade de resultado positivo à imuno-histoquímica, com tempo de evolução da doença menor, em comparação com pacientes com doença restrita às mucosas aero digestivas. Pacientes com acometimento mucoso no contexto de múltiplas lesões de pele, aqui arbitrariamente definidas como acima de seis, eram mais jovens que pacientes com lesões restritas ao nariz. Estas observações, embora ainda insuficientes pra sustentar algoritmos de abordagem de acordo com apresentação clínica, sugerem a existência de ao menos dois grupos de pacientes com acometimento mucoso por leishmaniose: um mais velho e com doença restrita à mucosa e seu entorno, de pior prognóstico e menor reatividade sorológica a teste baseado em antígenos de *L. braziliensis*, e outro mais jovem, com menos tempo de doença e presença de lesões cutâneas à distância, com maior probabilidade de cura e maior probabilidade de diagnóstico por identificação do parasito no tecido. Estas observações começam a

delinear alguns marcadores clínicos a serem explorados em futuros estudos, tais como a idade, o tempo de evolução dos sintomas e a presença e a localização das lesões de pele como possíveis critérios a comporem estratégias sistematizadas de testagem e abordagem terapêutica diferencial para pacientes com suspeita de leishmaniose com comprometimento mucoso.

Palavras-chave: manifestação clínica, diagnóstico, leishmaniose, mucosa

## ABSTRACT

Leishmaniasis with mucous involvement is the most neglected form of leishmaniasis. In Brazil, the mucosal form corresponds to about 6% of all cases of tegumentary leishmaniasis (TL) notified. However, there is a lack of well-defined criteria for the classification of leishmaniasis in its cutaneous and mucosal forms, which can generate inaccuracy in the morbidity data of the disease. Regarding the condition itself, mucosal involvement poses additional challenges to the diagnosis of leishmaniasis, either because of the difficulty in accessing mucosal surfaces or because of the scarcity of parasites in these sites. In this context, this study aims to identify demographic, clinical, laboratory and prognostic aspects capable of distinguishing the different clinical presentations observed for tegumentary leishmaniasis with mucosal involvement, as well as to describe the accuracy of a new monoclonal antibody for immunohistochemistry, two real-time polymerase chain reaction (PCR) tests (SYBER detection system for kDNA target and TaqMan detection system for SSU rRNA target) and a conventional PCR technique for hsp70 target, in addition to five serological tests based on immunoassay platform. At the Alda Lima Falcão outpatient clinic of the Reference Center for Leishmaniasis of the René Rachou Institute, between April 2017 and September 2020, 124 patients with mucosal manifestation and suspected leishmaniasis were recruited, 100 of which were confirmed with the disease by parasitological or molecular criteria. Patients were grouped according to clinical presentation, based on the presence, body location and number of skin lesions concomitant with the mucosal lesion. Some differences were observed between patients with various clinical presentations, namely, patients with exclusive mucosal lesion exhibited longer disease progression (12 months) compared to those with mucosal lesion associated with distant skin lesions (8 months), which, in turn, had a higher rate of involvement of the oral cavity (44.2% vs. 20%) and of positive immunohistochemical test (53% vs. 41%). In the subgroup of patients with skin lesions not adjacent to the mucosa, a shorter disease duration (3 vs. 11 months for those with skin lesions adjacent to the mucosa) was identified, median of 4 skin lesions per patient, predominantly ulcers (90%). It was also observed that patients with mucosal involvement with more than six skin lesions (here, disseminate form) were significantly younger (44 vs 62 years) than those with less than six skin lesions. Patients with mucosal leishmaniasis strictly affecting the topography of the nose, its mucosa, with or without involvement of the adjacent skin, have a significantly longer time of disease progression (12 months) compared to patients

with disease not restricted to the nose (8 months), which showed a higher rate of reactivity to the ELISA based on *L. braziliensis* extract (92.7% vs. 72.4%). On the other hand, those patients with mucosal involvement restricted to the upper aerodigestive tracts, with or without contiguous skin lesions, had a higher rate of no improvement in the 6-month follow-up (16.7% vs 3.5%), compared to patients with other clinical presentations. Regarding the test diagnostic's accuracy, in an assessment including all patients regardless of clinical presentation, we observed highest sensitivities for real-time PCR tests (94.2% for qPCR/Syber and 87% for qPCR/TaqMan), both with specificity around 85%, with no statistical difference between them. Among the immunoassays, moderate sensitivity was observed for two tests: 71.7% for in-house ELISA based on *L. braziliensis* antigen and 62.3% for commercial ELISA based on *L. infantum* antigens, with no statistical difference between them. The sensitivity of immunohistochemistry was 45%, with specificity of 90%. In summary, our results confirm the existence of distinct presentations for leishmaniasis with mucosal involvement, one form restricted to the nose or airway-digestive tract, with or without involvement of the adjacent skin, characteristic of older patients, with longer disease evolution time and typically with infiltrative-type skin lesions, being less likely to heal at six months of follow-up. Patients with skin lesions distant from the mucosal involvement site exhibited a higher proportion of ulcerated-type skin lesions and a higher probability of a positive immunohistochemical result, with a shorter time of disease evolution compared to patients with disease restricted to aerodigestive mucosa. Patients with mucosal involvement in the context of multiple skin lesions, here arbitrarily defined as over six as disseminated form, were younger than patients with lesions restricted to the nose. These observations, although insufficient to support approach algorithms according to clinical presentation, suggest the existence of at least two groups of patients with mucosal involvement by leishmaniasis: an older one with disease restricted to the mucosa and its surroundings, with worse prognosis and low serological reactivity to *L. braziliensis* antigen test, and a younger one, with less time of symptoms and presence of cutaneous lesions far from the mucosal site, with greater probability of cure and greater probability of diagnosis by identification of the parasite in the tissue. These observations begin to outline some clinical markers to be explored in future studies, such as age, time of symptoms and the presence and body location of skin lesions as possible criteria to compose systematic strategies of testing and treating patients with suspected leishmaniasis and mucosal involvement.

Key-Words: Palavras-chave: clinical manifestation, diagnosis, mucosal, leishmaniasis



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Número de casos de leishmaniose tegumentar na região, sub-regiões e em países selecionados das Américas, 2001-2017. ....	29
Figura 2. Avaliação da positividade de variações da técnica de PCR aplicada aos casos suspeitos de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	103
Figura 3. Avaliação da positividade da imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina entre casos de leishmaniose com comprometimento mucoso e controles, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	105
Figura 4. Avaliação da positividade dos testes de imunoensaio entre casos de leishmaniose com comprometimento mucoso e não casos, segundo critério de positividade informado pelo fabricante/desenvolvedor, Belo Horizonte, 2017-2020.....	107
Figura 5- Curva ROC para o teste ELISA VIRCELL®.....	110
Figura 6 - Curva ROC para o teste ELISA <i>in house</i> ELISA PCPP .....	111
Figura 7- Curva ROC para o teste ELISA <i>in house</i> LiHyV .....	111
Figura 8- Curva ROC para o teste ELISA SERION®.....	112
Figura 9 - Curva ROC para o teste ELISA <i>in house</i> $\beta$ -Tubulina .....	<sup>1</sup> 112
Figura 10 – Avaliação da positividade dos testes de imunoensaio entre casos de leishmaniose com comprometimento mucoso e controles, segundo critério de positividade estabelecido por curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	114

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Definições para leishmaniose mucosa adotadas pelas principais autoridades em saúde no âmbito nacional, regional e mundial .....	33
Quadro 2. Definições adotadas e categorias para as variáveis explicativas neste estudo.....	57
Quadro 3. Definições adotadas na análise segundo as exigências da convenção STARD.....	60
Quadro 4 Significância estatística (valores de p) para as comparações de sensibilidade, especificidade e acurácia entre os diferentes protocolos de PCR para <i>Leishmania spp</i> (complementa tabel 13). Belo Horizonte, 2017-2020.....	104
Quadro 5. Significância estatística (valor de p) para as comparações de sensibilidade, especificidade e acurácia entre os diferentes testes sorológicos (complementa Tabela 15), Belo Horizonte, 2017-2020 .....	109
Quadro 6. Significância estatística (valor de p) para as comparações de sensibilidade, especificidade e acurácia entre os diferentes testes sorológicos (complementa Tabela 17), Belo Horizonte, 2017-2020 .....	115
Quadro 7. Significância estatística (valor de p) para as comparações da área sob a curva ROC entre os diferentes testes sorológicos (complementa Tabela 18), Belo Horizonte, 2017-2020.	117

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Painel de soros com anticorpos para doenças infecciosas utilizado para compor a população de não-casos em estudo de acurácia, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	64
Tabela 2. Causas para não inclusão no estudo, Belo Horizonte, 2017-2020.....	72
Tabela 3. Diagnósticos confirmados nos 24 pacientes com comprometimento mucoso e sem confirmação de leishmaniose, Belo Horizonte, 2017-2020.....	73
Tabela 4. Positividade dos testes diagnósticos entre os casos com comprometimento mucoso por leishmaniose, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	75
Tabela 5. Características demográficas e clínicas de grupos de pacientes estratificados de acordo com confirmação ou não do diagnóstico de leishmaniose, Belo Horizonte, 2017-2020.....	77
Tabela 6. Apresentações clínicas, detalhes do tratamento e dados evolutivos dos pacientes com diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020.....	80
Tabela 7. Apresentações clínicas observadas entre os pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020. ....	82
Tabela 8. Características demográficas, clínicas, laboratoriais e evolutivas de pacientes com leishmaniose estratificados segundo a presença ou não de lesão cutânea concomitante, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	83
Tabela 9. Características demográficas, clínicas e evolutivas de pacientes com acometimento mucoso e cutâneo simultâneo, estratificados de acordo com a localização da lesão cutânea (contígua ou não contígua à mucosa), Belo Horizonte, 2017-2020.....	87
Tabela 10. Características demográficas, clínicas e evolutivas de pacientes com acometimento mucoso no contexto de leishmaniose cutânea localizada ou disseminada, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	91
Tabela 11. Características demográficas, clínicas e evolutivas de pacientes com LM estratificados de acordo com a localização da lesão: restrita ou não ao nariz, Belo Horizonte, 2017-2020.....	95
Tabela 12. Comparação entre pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso de via aero digestiva alta (com ou sem lesão de pele contígua) e cutâneo e pacientes com lesões de pele não contíguas e mucosas atípicas extra via aero- digestiva alta, Belo Horizonte, 2017-2020.....	99

Tabela 13. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	104
Tabela 14. Sensibilidade, especificidade e acurácia da imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	106
Tabela 15. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos baseados em imunoenensaio para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, critério positividade definido pelo fabricante/desenvolvedor, Belo Horizonte, 2017-2020.....	108
Tabela 16. Pontos de corte da absorvância do ELISA para definição de positividade dos testes, segundo informação do fabricante/desenvolvedor e definição por curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	113
Tabela 17. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos baseados em imunoenensaio para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, critério positividade definido por curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020.....	115
Tabela 18. Estimativa do desempenho dos testes sorológicos de acordo com área sob a curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020 .....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AM</b>	Antimoniato de meglumina estibugluconato de sódio
<b>Anca p e c</b>	<i>Anti-neutrophil cytoplasm antibodies (p e c)</i>
<b>BH</b>	Belo Horizonte
<b>COLTEC</b>	Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais
<b>cPCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase convencional
<b>CRL-IRR</b>	Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto René Rachou
<b>DATASUS</b>	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DO</b>	Densidade ótica
<b>EDTA</b>	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EV</b>	Endovenosa
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FN</b>	Falso negativo
<b>FP</b>	Falso positivo
<b>HIV</b>	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>hsp70</b>	<i>Heat shock protein 70</i>
<b>IC</b>	Intervalo de confiança
<b>IDRM</b>	Intradermorreação de Montenegro
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>IM</b>	Intramuscular

<b>IQ</b>	Intervalo Interquartil
<b>kDNA</b>	DNA de cinetoplasto
<b>L.</b>	<i>Leishmania</i>
<b>LAMP</b>	<i>Loop mediated isothermal amplification</i>
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LCD</b>	Leishmaniose cutânea difusa
<b>LM</b>	Leishmaniose Mucosa
<b>LRV1</b>	<i>Leishmania</i> vírus 1
<b>LT</b>	Leishmaniose Tegumentar
<b>LV</b>	Leishmaniose visceral
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>NNN</b>	Meio de cultivo Neal, Novy e Nicolle
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OPAS</b>	Organização Pan-Americana da Saúde
<b>OTR</b>	Otorrinolaringologista
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PBS<sub>t20</sub></b>	Tampão fosfato salino adicionado tween-20
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>qPCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>HRM</b>	Curva de Melting de alta resolução
<b>RFLP</b>	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>

<b>RIFI</b>	Reação de Imunofluorescência Indireta
<b>RMBH</b>	Região metropolitana de Belo Horizonte
<b>ROC</b>	<i>Receiver operating curve</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SINAN</b>	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
<b>SISLAB</b>	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
<b>SS</b>	Estibugluconato de sódio
<b>SSU rRNA</b>	Subunidade menor do RNA ribossomal
<b>STARD</b>	<i>Standards for reporting diagnostic accuracy studies</i>
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SVS</b>	Secretaria de Vigilância em Saúde
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TCB</b>	Tampão carbonato bicarbonato
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>VDRL</b>	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
<b>VN</b>	Verdadeiro negativo
<b>VP</b>	Verdadeiro positivo
<b>vs.</b>	<i>Versus</i>

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos.....	28
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>29</b>
3.1 Distribuição e morbimortalidade.....	29
3.2 Leishmaniose tegumentar no Brasil .....	31
3.3 <b>Leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso</b> .....	32
<b>3.3.1 Leishmaniose com acometimento mucoso e o vírus de RNA de <i>Leishmania</i> spp.</b> .....	34
3.3.2 Aspectos clínicos da leishmaniose com comprometimento mucoso: manifestações..	35
3.3.3 Aspectos clínicos da leishmaniose com comprometimento mucoso: diagnóstico.....	36
3.3.3.1 Diagnóstico parasitológico.....	37
3.3.3.2 Diagnóstico molecular .....	38
<b>3.3.3.3 Diagnóstico imunológico</b> .....	40
3.4 Aspectos clínicos da leishmaniose com comprometimento mucoso: tratamento.....	42
3.5 Diferentes classificações para leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso .....	44
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>49</b>
4.1 Tipo de estudo.....	49
4.2 Aprovação ética.....	49
4.3 Local do estudo .....	49
4.4 Recrutamento para coorte .....	50
4.4.1 Critérios de inclusão nesta análise transversal .....	50
4.5 Definição de caso de leishmaniose entre participantes com comprometimento mucoso ..	50
4.6 Abordagem de casos suspeitos de leishmaniose com acometimento mucoso, segundo protocolo do CRL-IRR.....	51
4.7 Desfechos clínicos avaliados após o tratamento de leishmaniose.....	52
4.8 Métodos diagnósticos utilizados para confirmação infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	53
4.8.1 Procedimentos para obtenção das amostras .....	53
4.8.1.1 Biópsia da lesão de pele.....	53
4.8.1.2 Biópsia da lesão mucosa .....	53
4.8.1.3 Aspirado da borda da lesão .....	54

4.9. Métodos laboratoriais para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar, de acordo com o protocolo do CRL-IRR.....	54
4.9.1 <i>Imprint</i> .....	54
4.9.2 Cultivo de aspirado de lesão de pele para detecção de <i>Leishmania</i> spp. ....	54
4.9.3 Exame histológico .....	55
4.9.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativo com alvo gênico DNA de cinetoplasto (kDNA) .....	55
4.9.5 Identificação da espécie de <i>Leishmania</i> .....	56
4.10 Condução do estudo .....	57
4.11 Avaliação de métodos para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso .....	59
4.11.1 Detecção de anticorpos específicos .....	62
4.11.1.1 Imunoensaio ELISA VIRCELL® ( <i>Leishmania</i> ELISA IgG+IgM).....	64
4.11.1.2 Imunoensaio ELISA SERION ( <i>Leishmania</i> ELISA IgG).....	65
4.11.1.3 Imunoensaio utilizando proteínas $\beta$ -TUBULINA e LiHyV .....	66
4.11.1.4 Imunoensaio utilizando antígeno solúvel de <i>L. braziliensis</i> .....	67
4.11.2 Técnica de imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina .....	68
<b>4.11.3 Testes moleculares em investigação para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso</b> .....	69
4.11.3.1 PCR em tempo real usando sistema Syber.....	69
4.11.3.2 PCR em tempo real usando sistema Taqman .....	69
4.12 Análise dos dados.....	70
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>72</b>
5.1 Características gerais da população estudada .....	72
5.2 Investigação etiológica do comprometimento mucoso .....	74
5.3 Tratamento realizado em pacientes com comprometimento mucoso por leishmaniose....	75
5.4 Avaliação das diferentes apresentações clínicas de leishmaniose tegumentar com comprometimento mucoso e seus aspectos demográficos, diagnósticos e prognósticos .....	76
5.4.1 Comparação entre pacientes com confirmação ou não de leishmaniose .....	76
5.4.2 Principais características clínicas dos casos com confirmação de leishmaniose.....	79
5.4.3 Comparação entre pacientes com lesão mucosa exclusiva e pacientes com lesão mucosa e cutânea simultâneas .....	83
5.4.4 Comparação entre pacientes com lesão de pele contígua à mucosa e aqueles com lesão de pele não contígua à mucosa.....	86
5.4.5 Comparação entre pacientes com lesão de pele localizada e aqueles com lesão de pele disseminada .....	90

5.4.6	Comparação entre pacientes com lesão de pele ou mucosa restrita ao nariz e aqueles com lesão de pele ou mucosa não restrita ao nariz.....	94
5.4.7	Comparação entre pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso de via aero digestiva alta (com ou sem lesão de pele contígua) e cutâneo e pacientes com lesões de pele não contíguas e mucosas atípicas extra via aero digestiva alta .....	98
5.5	Acurácia dos testes para diagnóstico da leishmaniose com comprometimento mucoso .	102
5.5.1	Testes moleculares.....	102
5.5.2	Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina.....	105
5.5.3	Imunoensaios comerciais e <i>in house</i> baseados em antígenos de <i>Leishmania</i> spp. aplicados ao diagnóstico da doença da leishmaniose com comprometimento mucoso – critério de positividade definido pelo fabricante/desenvolvedor .....	106
5.5.4	Imunoensaios comerciais e <i>in house</i> baseados em antígenos de <i>Leishmania</i> spp. aplicados ao diagnóstico da doença da leishmaniose com comprometimento mucoso - critério de positividade definido por curva ROC .....	110
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>130</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>132</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>142</b>
	ANEXO I - Parecer Comité de ética.....	142
	ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	146
	ANEXO III - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido .....	147
	ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 7 a 12 anos.....	148
	ANEXO V – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 7 a 13 anos.....	149
	ANEXO VI - Ficha de avaliação otorrinolaringológica.....	150
	ANEXO VII – Ficha de Primeira Consulta.....	152
	ANEXO VIII – Ficha de Retorno.....	158
	ANEXO IX – Ficha de Resumo de Caso.....	160

## 1 INTRODUÇÃO

Este estudo aborda uma variante pouco estudada da leishmaniose tegumentar (LT): a sua forma com comprometimento mucoso. LT é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das seis mais importantes doenças infecciosas parasitárias (WHO, 2010). Embora reconhecida como uma das manifestações mais desfigurantes da doença e uma complicação tardia especialmente relevante para a doença prevalente no continente americano, a leishmaniose com comprometimento mucoso é ainda cercada por escassa evidência científica e carece de uma definição operacional abrangente.

Os termos “*leishmaniose mucosa*” e “*leishmaniose muco-cutânea*” são muitas vezes empregados indistintamente na literatura, designando condições frequentemente distintas. Essa falta de padronização de terminologia, mais que um preciosismo de linguagem, representa mais um empecilho na busca de evidências robustas para o enfrentamento da doença. Ao segregar ou agrupar condições próximas, mas não exatamente idênticas, são produzidos dados imprecisos sobre a morbidade da doença e cria-se um viés adicional na avaliação dos marcadores prognósticos e interpretação do papel dos testes diagnósticos e do padrão de resposta aos tratamentos disponíveis.

Alheio ao artificialismo das definições arbitrárias, o comprometimento mucoso pode ocorrer em diferentes apresentações clínicas da LT, a forma clássica com lesão exclusiva nas mucosas, de forma concomitante ao acometimento cutâneo, em localização contígua ou não à lesão de pele ou ainda no contexto da forma disseminada. Menos comum, o comprometimento isolado de mucosa exposta, como lábios ou conjuntiva ocular, está também descrito, o que suscita a possibilidade de tratar-se de lesão primária ou sítio de inoculação do parasito. Pouco se sabe sobre a implicação das apresentações clínicas com comprometimento mucoso em relação ao desempenho dos diferentes testes diagnósticos, resposta terapêutica e prognóstico. Possivelmente em decorrência da falta de evidência científica estratificada por apresentação clínica, as principais recomendações de manejo da leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso, produzidas pela OMS, Organização Pan-Americana da Saúde e Ministério da Saúde (MS) do Brasil, não trazem qualquer observação em relação a estas diferenças clínicas. Além deste aspecto, muitos outros permanecem não resolvidos em relação à leishmaniose com acometimento mucoso,

envolvendo custo-efetividade das diferentes alternativas terapêuticas e fatores relacionados à recidiva.

O Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto René Rachou (CRL-IRR), Fiocruz Minas, é uma unidade técnica regulamentada pela FIOCRUZ como Laboratório de Referência Nacional em Leishmaniose para o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (SISLAB) da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do MS. Sua principal missão é subsidiar ações de controle das leishmanioses no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Neste sentido, a constatação da fragilidade de sustentação das recomendações de manejo, especialmente para a leishmaniose com acometimento mucoso, e a inesperada mortalidade relacionada a essa forma clínica, detectada no Brasil nos últimos anos (SOUZA, 218), sinalizaram para a urgente necessidade de avaliação da abordagem atual da doença, o que justificou o início da primeira coorte de casos com acometimento mucoso por LT, em Belo Horizonte, Minas Gerais, a partir de 2017. Este estudo representa o primeiro produto desta coorte e teve como foco principal a identificação de subgrupos distintos de pacientes com LT com acometimento mucoso que, eventualmente, se beneficiariam de abordagem diagnóstica e terapêutica específicas, baseada no desempenho de testes diagnósticos, tolerância e resposta às diversas opções terapêuticas. Além de proposta de classificação clínica para a LT com acometimento mucoso, espera-se que os resultados permitam a proposição de um algoritmo diagnóstico, fornecendo uma base racional para a orientação terapêutica. Em última análise, espera-se que nossas conclusões sejam úteis, incorporadas ao SUS e possam contribuir para uma abordagem mais eficiente da leishmaniose no Brasil.

É importante ressaltar a situação sanitária mundial no contexto em que esse trabalho foi desenvolvido. Em 31 de dezembro de 2019, a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi alertada sobre vários casos de pneumonia na cidade de Wuhan na República Popular da China. Tratava-se de uma nova cepa de coronavírus que não havia sido identificada antes em seres humanos. Em 30 de janeiro de 2020, a OMS declara o surto do novo coronavírus uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional e em 11 de março de 2020, a COVID-19 foi caracterizada como uma pandemia. No Brasil, o primeiro caso foi diagnosticado em fevereiro de 2020, tendo atingido no final de 2021 a marca de 619.056 óbitos e mais de 22 milhões infecções pelo SARS-CoV-2. O adoecimento maciço

da população e as medidas de isolamento implementadas repercutiram não apenas no contexto epidemiológico e da assistência à saúde. Impactou significativamente a organização social e as dimensões econômicas e políticas da vida da população brasileira. Ainda que mantido o funcionamento do CRL/IRR, houve significativa redução no encaminhamento de pacientes e descontinuidade da assistência dos casos em acompanhamento, o que inevitavelmente reduziu a oportunidade para recrutamento de participantes para esse estudo e impactou no acompanhamento dos pacientes após finalizado o tratamento.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Propor algoritmo diagnóstico e recomendações de manejo individualizado para as diferentes apresentações clínicas de leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso a serem incorporados pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Identificar aspectos demográficos, clínicos, laboratoriais e evolutivos capazes de distinguir as diferentes apresentações clínicas observadas para leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso, a fim de propor uma classificação operacional para a doença.
2. Caracterizar as diferentes apresentações clínicas entre casos confirmados de leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso notificados em centro de referência em Belo Horizonte, Minas Gerais;
3. Descrever a acurácia de testes de imunoensaio enzimático comerciais e *in house*, de imuno-histoquímica baseada anticorpos anti-peroxidoxina e da reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso;

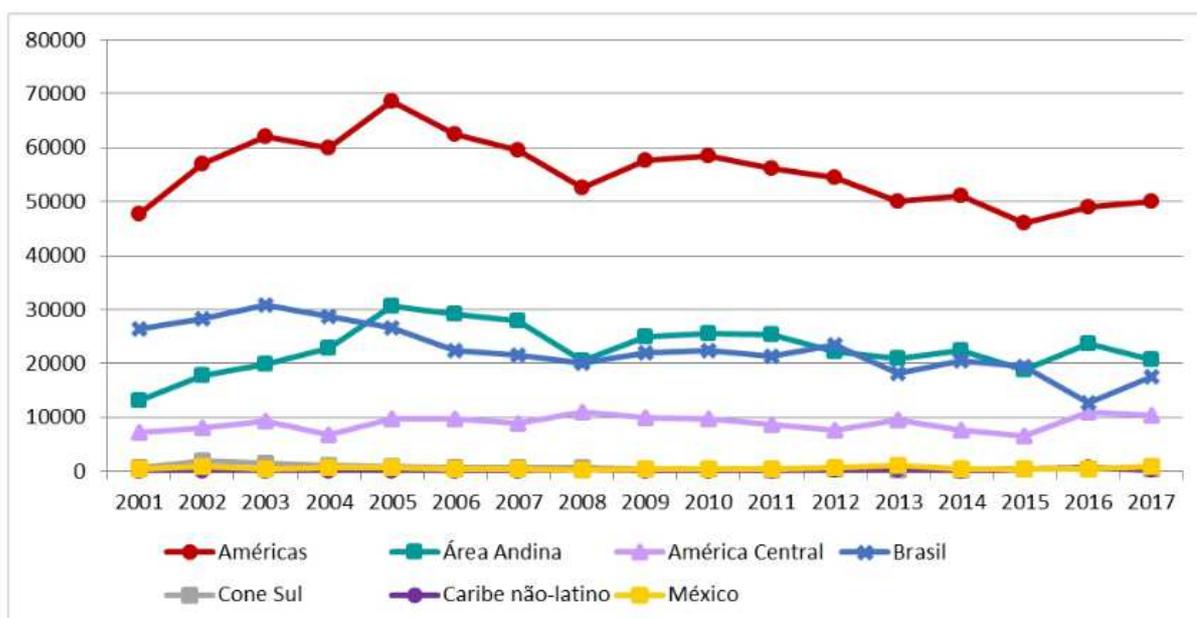
### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Distribuição e morbimortalidade

A leishmaniose tegumentar (LT) possui ampla distribuição geográfica, sendo uma das principais doenças tropicais negligenciadas de importância em saúde pública e figura entre as dez principais causas de invalidez não fatal (BRASIL, 2017a; WHO, 2010). Das diferentes formas clínicas causadas pela infecção humana por parasitos do gênero *Leishmania*, a LT é a mais prevalente no mundo, sendo registrada em 88 países e distribuída em quatro continentes, Ásia, África, Europa e América. Cerca de 95% dos casos de LT ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (WHO, 2010).

Nas Américas, a Organização Panamericana da Saúde (OPAS) tem empreendido esforços para reunir dados de notificação de todos os países através do sistema de notificação regional (SisLeish – OPAS/OMS). De acordo com essa plataforma, entre 2001 e 2017, dezessete países notificaram 940.396 casos com a forma cutânea, mucosa ou mucocutânea (OPAS, 2019b), com média anual de 55.317 casos (Figura 1).

**Figura 1. Número de casos de leishmaniose tegumentar na região, sub-regiões e em países selecionados das Américas, 2001-2017.**



Fonte: Informe de Leishmanioses N° 7 - Março, 2019

Aproximadamente metade dos casos de LT das Américas é registrada no Brasil, que também se sobressai na região pela robustez do sistema de vigilância, garantido principalmente pela obrigatoriedade da notificação para todas as formas de leishmaniose. De acordo com o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, entre 2007 e 2019, foram registrados 270.361 casos de LT no Brasil, sendo que em 16.225 (6%) deles a apresentação clínica indicada na ficha de notificação era a forma mucosa. Além do conhecimento das principais características demográficas da população acometida por leishmaniose, os bancos de registro de dados clínicos gerados pelo sistema de vigilância epidemiológica no Brasil têm permitido importantes análises das tendências temporal e espacial da doença (PORTELLA; KRAENKEL, 2021), da magnitude de sua morbidade (BEZERRA et al., 2018) e, mais recentemente, de inesperada alta mortalidade relacionada à LT (SOUZA, 2018).

De acordo com a dissertação de Souza (2018), de um total de 126.103 casos de LT notificados ao SINAN entre 2007 e 2014, 974 casos apresentaram desfecho fatal, uma taxa de letalidade de 0,77%, muito acima da registrada no mesmo período, por exemplo, para dengue (0,09%) e semelhante à letalidade de malária fora da região amazônica, no ano de 2012 (0,8%), doenças de acometimento sistêmico e potencial letal bem conhecido. Nesta análise, observou-se ainda que casos de LT notificados como forma mucosa tinham risco de evolução para óbito 1,7 vezes maior que casos com a forma clínica cutânea, o que a define como um fator relacionado à ocorrência de óbito. Ainda sem uma explicação clara para esta observação, algumas justificativas vêm sendo especuladas, como a maior probabilidade de complicação fatal pela proximidade da lesão mucosa com o sistema respiratório, o que poderia estar associado não apenas à insuficiência respiratória pelo acometimento e obstrução da via aérea, mas também a infecção bacteriana secundária. Outro fator que poderia justificar a associação de acometimento mucoso com óbito é a maior média de idade dos pacientes acometidos. Neste sentido, o acometimento mucoso seria marcador de um subgrupo com idade mais avançada, o que explicaria a maior propensão a complicações clínicas e risco de morte. Por fim, a toxicidade ao tratamento também desponta como uma possível explicação para o óbito, considerando que dentre todas as formas de LT, a forma mucosa é a que recebe a maior dose acumulada de tratamento, na maioria das vezes, derivados de antimônio. São todas possibilidades cuja influência na evolução dos casos não se encontra ainda confirmadas. Sob a perspectiva regional, a subnotificação de casos, incompletude dos registros e diferenças de

terminologia entre os países das Américas impede uma estimativa numérica fidedigna sobre a magnitude do problema na região.

### 3.2 Leishmaniose tegumentar no Brasil

Sete espécies de *Leishmania* são responsáveis pela LT no Brasil, sendo seis pertencentes ao subgênero *Viannia*: *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lindeberg*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi* e uma pertencente ao subgênero *Leishmania*: *L. amazonensis* (LAINSON, 2010; TELES et al., 2013).

A *L. braziliensis* é a espécie de maior prevalência entre as leishmanioses humanas no Brasil, relacionada a acometimento cutâneo e de mucosas. Apresenta distribuição em todo o território nacional, além de vários países da América Central e do Sul (de Belize até a Argentina), sendo provável que nem todas correspondam exatamente ao mesmo parasito, tratando-se de fato de um complexo de subespécies (SOUZA; SOUZA; BOTELHO, 2012). Existem poucas informações sobre seus hospedeiros silvestres, com relato de identificação de parasitos semelhantes em roedores (*Akodon* spp., *Proechimys* spp., *Rattus* spp., *Oryzomys* spp. e *Rhipidomys* spp.) e no marsupial *Didelphis* spp. Cavalos, cães, jumentos e até gatos apresentam-se como hospedeiros na transmissão peri doméstica. (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2017)

Diversos fatores estão envolvidos na determinação das diferentes manifestações clínicas da doença, como a espécie de *Leishmania* e a resposta imune do hospedeiro. No Brasil, a classificação recomendada pelo Ministério da Saúde (MS) divide a LT em três diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM) (BRASIL, 2017), assim caracterizadas:

- *Leishmaniose cutânea (podendo ser localizada ou disseminada): caracterizada pela presença de lesões únicas ou múltiplas acometendo o tegumento. Pode apresentar-se com variado polimorfismo que vai desde as formas cutâneas ulceradas simples até as formas verrucosas, papulosas e impetigoides, associadas ou não a lifadenopatia. Geralmente indolor, aparece no local da picada do vetor. Caso não tratadas, as lesões podem evoluir para a cura espontânea em período de*

*alguns meses a poucos anos, podendo também permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas de surgimento posterior.*

- *Leishmaniose cutânea difusa (LCD): apresenta como característica a presença de lesões papulosas, não ulceradas, disseminadas, que acometem vários seguimentos corporais. Causada pela *L. amazonensis* está associada à deficiência de imunidade. São consideradas formas raras e são refratárias ao tratamento.*
- *Leishmaniose mucosa (LM): mais associada a *L. (V). braziliensis* nas Américas, é caracterizada por lesões destrutivas nas mucosas das vias aéreas superiores, principalmente, sendo a forma clássica de LM secundária à lesão cutânea. É comum que pacientes com LM apresentem cicatriz indicativa de LC anterior. Pode apresentar lesões cutânea e mucosa concomitantemente. Apresentam caráter evolutivo, sendo mais frequente o acometimento nasal, podendo também ocorrer formas orais, laringeais e até traqueais ou genitais. Costumam destruir o septo nasal, conferindo aos doentes o aspecto conhecido como nariz de tapir ou de anta. São conhecidas nas Américas como “spundia” denominação dada por Escomel, 1911.*

### **3.3 Leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso**

Uma das dificuldades encontrada nos estudos da leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso é a falta de uma definição clara dos termos “*leishmaniose mucosa*” e “*leishmaniose muco-cutânea*”. Empregados com significados distintos pelas diferentes entidades de saúde e na literatura em geral, a falta de padronização de terminologia pode gerar evidências equivocadas usadas no enfrentamento da doença. No quadro 1 estão descritos os diferentes conceitos utilizados pela OMS, OPAS e MS.

**Quadro 1: Definições para leishmaniose mucosa adotadas pelas principais autoridades em saúde no âmbito nacional, regional e mundial**

Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010 (WHO, 2010)	Leishmaniose mucosa: acometimento exclusivo de mucosas, predominantemente nasal, de surgimento tardio, em geral anos após a ocorrência de lesões de pele.
Manual de procedimentos para vigilância e controle de leishmanioses nas Américas da Organização Panamericana da Saúde (OPAS, 2019a)	Leishmaniose mucosa ou mucocutânea: complicação de metástase, por via hematogênica ou linfática, de lesão de pele distante, ou mais raramente, através da extensão para as membranas mucosas de lesão na face ou pela picada direta do vetor na membrana mucosa.
Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde do Brasil, 2017 (BRASIL, 2017)	Leishmaniose mucosa se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea.

Em meio à ausência de uma definição comum, universalmente aceita, a reunião de dados acurados da morbi-letalidade da leishmaniose com comprometimento mucoso é compreendida como a primeira etapa de enfrentamento do problema, o que justifica um esforço de notificação e análise crítica.

Segundo a (OPAS (2019), a média de pacientes com algum acometimento mucoso nas Américas é de 3,94%, estável desde 2012, sendo cinco países responsáveis por 86,5% dos casos: Bolívia, Brasil, Colômbia, Paraguai e Peru. Percentual similar de casos com acometimento mucoso é descrito no Brasil, estimado pela OPAS em 4,3%, em 2019 (OPAS, 2020). Dependendo do período e da fonte, variações na estimativa do comprometimento mucoso são frequentes e se devem em grande parte à inexistência de uma definição clara do que seja a forma mucosa da leishmaniose.

Em todo o mundo, leishmaniose com acometimento mucoso está descrita por *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum*, entretanto, é mais comumente associada à *L. braziliensis*, espécie restrita à América do Sul. Para as demais espécies, o achado é considerado uma manifestação de ocorrência excepcional (REITHINGER et al., 2007). Entretanto, são poucos os estudos que caracterizaram do ponto de vista etiológico pacientes com comprometimento mucoso, o que também carece de atenção. Como exemplo, no Peru, 69% dos casos de LT com lesões em mucosa estavam relacionados à *L. braziliensis*. Este mesmo estudo identificou cepas híbridas de *L. braziliensis* e *L. peruviana* entre os casos, levantando a possibilidade de mais espécies causando doença mucosa na região (NOLDER et al., 2007). Na região amazônica do Brasil, GUERRA e colaboradores (2011) também chamaram atenção para ocorrência de leishmaniose mucosa por *L. guyanensis*, 35% dos casos de uma série.

### **3.3.1 Leishmaniose com acometimento mucoso e o vírus de RNA de *Leishmania* spp.**

Há alguns anos, a presença de um RNA vírus de comportamento endo simbiótico, denominado *Leishmania* vírus 1 (LRV1), foi inicialmente identificado em *L. guyanensis* e posteriormente descrito em outras espécies de *Leishmania*, incluindo *L. braziliensis* (SALINAS et al., 1996). A seguir, a presença do LRV1 foi descrita em fragmento de tecido de pacientes com a forma mucosa da leishmaniose, sugerindo a participação da coinfeção como possível fator relacionado à gravidade e extensão das suas manifestações (CANTANHÊDE et al., 2015). No mesmo sentido, principalmente o LRV1, tem sido estudado como um fator de virulência para a LT, sendo relacionado à metástase das lesões, a uma maior chance de desenvolvimento de leishmaniose com acometimento mucoso e lesões de pele concomitantes, estando associado a falhas terapêuticas e persistência do parasito, aumentando as chances de recidiva (BOURREAU et al., 2016; OLIVIER, 2011). Segundo estes estudos, o LRV atua como um fator de virulência interferindo na ativação do inflamossoma NLRP3, importante modulador pró-inflamatório nos estágios iniciais da infecção, levando à eliminação ineficaz do parasito nos tecidos. A inibição da ativação do inflamossoma parece ocorrer por um mecanismo dependente do receptor TLR3 (*Toll-like-receptor 3*), o qual é reconhecido pelo LRV no compartimento endossomal. A cascata de sinalização celular desencadeada pela ativação de TLR3 induz a via autofágica em macrófagos infectados, promovendo a degradação de NLRP3 e limitando, conseqüentemente, a ativação do inflamossoma NLRP3 (DE CARVALHO et al., 2019). A propriedade “anti-inflamatória” do LRV associado à *Leishmania* pode resultar em uma

manifestação silenciosa desses parasitos no hospedeiro, contribuindo para o desenvolvimento da doença crônica de longa duração (OLIVIER; ZAMBONI, 2020).

Embora muitos trabalhos relacionem o LRV1 ao aumento da virulência, ainda há poucos dados epidemiológicos sobre assunto, visto que a frequência do vírus ainda é pouco descrita em amostras clínicas. No geral, todos os estudos concordam que a gravidade e a cronicidade da doença não podem ser associadas somente à presença do LRV1. Da mesma forma, a presença do vírus por si só não seria suficiente para modular a resposta imune, sendo hipotetizada uma relação direta do risco com a carga viral (CANTANHÊDE et al., 2015; HARTLEY et al., 2014; PEREIRA et al., 2013).

### **3.3.2 Aspectos clínicos da leishmaniose com comprometimento mucoso: manifestações**

As lesões em mucosas se apresentam como úlceras com potencial destrutivo-perfurante ou são infiltrativas e vegetantes. GUIMARÃES e colaboradores (2005) descreveram que clinicamente, a leishmaniose mucosa acomete, preferencialmente, o nariz e se caracteriza por coriza, obstrução nasal e, em situações mais avançadas, presença de odor fétido. As lesões atingem o septo cartilaginoso nasal e podem se estender para a parede lateral e assoalho, região do palato, úvula e, em menor frequência, ocorre envolvimento da faringe, laringe, cordas vocais e lábio superior, com graus diversos de infiltração, granulação e ulceração. O septo nasal cartilaginoso é tradicionalmente reconhecido como o local mais frequentemente acometido (CASALLE et al., 2020), e muito raramente, mucosa genital (CABELLO; CARABALLO; MILLÁN, 2002) e ocular (VERALDI et al., 2010) podem também ser afetados. Nos casos mais crônicos e graves, pode haver comprometimento de estrutura óssea adjacente, deformidades nas vias digestivas e aéreas, com transtornos na deglutição, fonação e respiração, além de dano estético capaz de gerar estigmatização e impacto emocional. Existem ainda alguns relatos de óbito em função de complicações respiratórias (CRUZ et al., 2016; MARSDEN, 1986; PESSOA; BARRETO, 1948).

A evolução típica da doença se inicia como uma nodulação esbranquiçada sem ulceração, habitualmente observada no septo cartilaginoso (área de Kiesselbach), assoalho e na parede lateral dos cornetos nasais. Posteriormente, aparece uma lesão granulosa fina, caracterizada por ulceração superficial, do septo anterior, conchas inferiores e assoalho da fossa nasal. A seguir, no estágio de ulceração profunda, a reação tecidual é mais intensa, com tecido de

granulação aberrante e infiltração da mucosa, tornando o septo nasal alargado. Às vezes, ocorre infiltração edematosa da própria pirâmide nasal. Nessa fase, crostas hemáticas podem ser observadas sobre o septo, conchas inferiores e assoalho das fossas nasais. Essas lesões se caracterizam pela excessiva fragilidade, sangrando com muita facilidade ao toque da mucosa. O paciente pode queixar-se de sensação dolorosa na pirâmide nasal, rinorreia de característica sanguinolenta e emissão de crostas hemáticas. Obstrução nasal é um sintoma frequente nessa fase da doença. Externamente, em virtude do processo inflamatório que envolve as cartilagens e o tecido celular subcutâneo e a própria pele da base da pirâmide nasal, o nariz adquire o aspecto conhecido pelo nome de nariz de tapir ou anta. Finalmente, nas fases avançadas da doença ocorre envolvimento cartilaginoso do septo anterior com necrose e, às vezes, comprometimento da columela. É nesse estágio que se estabelece a perfuração do septo cartilaginoso, também com infiltração acentuada do septo posterior. Nos casos mais graves, pode ocorrer destruição total da columela e queda da ponta do nariz, transformando a fossa nasal numa verdadeira cloaca, às vezes, com perfuração do dorso da pirâmide nasal. Em alguns casos pode ocorrer destruição total do septo anterior, restando ainda a columela inteira, ficando o nariz selado. Crostas extensas de aspecto hemorrágico ou mesmo decorrentes do ressecamento da secreção mucosa provocada pelo alargamento da estrutura nasal interna, podem ser observadas em consequência da lesão tecidual, representada pela destruição do septo cartilaginoso e conchas inferiores. A intensidade do processo inflamatório e a consequente destruição tecidual podem, portanto, interferir de forma significativa na estética do nariz.

### **3.3.3 Aspectos clínicos da leishmaniose com comprometimento mucoso: diagnóstico**

O diagnóstico da leishmaniose com acometimento mucoso traz desafios adicionais aos já enfrentados para o diagnóstico da forma cutânea da doença, em função da natureza inflamatória preponderante do dano tissular e da já reconhecida escassez parasitária na lesão, dificultando o diagnóstico definitivo que idealmente exige a demonstração do agente infeccioso. Esta dificuldade justifica o grande percentual de casos notificados no Brasil por critérios clínico-epidemiológicos, o que, segundo dados de vigilância, ocorreu em 25% dos casos entre 2012 e 2018 (DATASUS). Trata-se de constatação preocupante: a não confirmação da etiologia do acometimento mucoso impacta diretamente a segurança e o prognóstico do paciente, em função da existência de diversas outras doenças que podem cursar com lesões mucosas indistinguíveis da leishmaniose, tais como linfoma,

paracoccidiodomicose, hanseníase, sífilis, vasculites, dentre outras (BRASIL, 2017a; DINIZ; COSTA; GONÇALVES, 2011; MARSDEN, 1986; WHO, 2020), exigindo tratamento inteiramente diverso.

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos da imunologia e da biologia celular, o diagnóstico da leishmaniose com acometimento mucoso ainda apresenta lacunas importantes. Mesmo em centros urbanos com acesso a recursos diagnósticos, nenhum teste ocupa hoje a posição de padrão ouro para o diagnóstico da doença, reunindo além de acurácia, nível adequado de padronização e acessibilidade aos pacientes. Na rotina laboratorial, técnicas parasitológicas, moleculares e sorológicas são usadas na tentativa de minimizar a deficiência de cada uma isoladamente.

### **3.3.3.1 Diagnóstico parasitológico**

Os exames parasitológicos compreendem pesquisa microscópica do parasito por exame direto de espécimes clínicos ou por sua detecção em meio de cultivo.

Na leishmaniose tegumentar de modo geral, a pesquisa direta pelo parasito é feita por meio da visualização em microscópio de esfregaços produzidos a partir de biópsias, escarificação ou punção aspirativa da borda das lesões, corados com *Giemsa* ou hematoxilina-eosina, o que permite a visualização das formas amastigotas do parasito. Especificamente para a investigação de lesões mucosas, diversos estudos nas Américas revelaram sensibilidade do exame direto por aposição (“*imprint*”), realizado com fragmento colhido por biópsia de lesão mucosa, em torno de 9 a 30% (DE MELLO et al., 2011; FABER et al., 2003; GALLUZZI et al., 2018; NAMAZI et al., 2021; SCHUBACH et al., 2001).

Já o cultivo de parasitos presentes no fragmento de mucosa em meio axênico *in vitro* em meio NNN (*McNeal, Novy, Nicolle*) enriquecido com LIT (*Liver infusion triptose*) pode aumentar a sensibilidade do diagnóstico parasitológico, mas a técnica tem custo elevado e pode requerer até quatro semanas para definição diagnóstica. No entanto, as maiores desvantagens do cultivo para o diagnóstico da leishmaniose com acometimento mucoso são baixa sensibilidade, variando de 0% a 30%, a necessidade de estrutura laboratorial com instalações para cultivo e a possibilidade de contaminação por bactérias ou fungos, que é comum (GOTO; LINDOSO, 2010; MUVDI-ARENAS; PEDRAS, 2002a).

O exame histopatológico de fragmento de mucosa pode confirmar o diagnóstico de leishmaniose pela observação do parasito no tecido ou apenas sugeri-lo, diante da presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário tendendo a formar granulomas. Mesmo que não seja suficiente para confirmar leishmaniose, a avaliação histológica é frequentemente útil na busca pela confirmação de outras doenças com sintomatologia similar à leishmaniose, como por exemplo, infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* ou doenças neoplásicas.

Como ferramenta complementar durante o exame histológico, a técnica de imunohistoquímica (IHQ), descrita por (COONS; CREECH; JONES, 1941) permite demonstrar presença e localização de determinado antígeno em cortes histológicos, através do uso de anticorpos específicos que, após revelação, produzem coloração visível ao microscópio óptico. AMATO e colaboradores (1998), avaliando 15 pacientes com leishmaniose mucosa, encontrou 100% de positividade para a técnica de IHQ utilizando anticorpos policlonais obtidos da inoculação de *L. amazonenses* em hamster. Um estudo realizado em Minas Gerais e São Paulo por SANCHEZ-ROMERO e colaboradores (2019) encontraram positividade de 82,3%, em pacientes com leishmaniose com acometimento mucoso, também utilizando anticorpos policlonais. FREIRE (2021), utilizando anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina, encontrou 85,7% de sensibilidade e 97,3% de especificidade em amostras de pele em pacientes com leishmaniose cutânea. Até o momento, não foram publicados estudos avaliando o desempenho da IHQ com anticorpos monoclonais em pacientes com leishmaniose com acometimento mucoso.

### **3.3.3.2 Diagnóstico molecular**

O desenvolvimento dos métodos moleculares, em especial a reação em cadeia da polimerase (PCR), seja em sua forma convencional (cPCR) ou em tempo real (qPCR) para a confirmação da infecção por *Leishmania* spp. tem representado avanço no diagnóstico da leishmaniose com comprometimento mucoso (GOMES et al., 2015). A experiência acumulada até agora confirma tratar-se de ferramenta sensível e específica, dependendo do alvo gênico escolhido (DISCH et al., 2005; GOMES et al., 2017; MESA et al., 2020; PIRMEZ et al., 1999). Porém, o exame ainda é considerado de alto custo e dependente de

infraestrutura laboratorial sofisticada, o que reduz a sua aplicação de forma descentralizada na maioria dos países endêmicos.

Além do alto desempenho diagnóstico, a técnica molecular representa uma das possibilidades para a identificação das diferentes espécies de *Leishmania*, o que foi estabelecido através da técnica PCR-RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*) (MUVDI-ARENAS; OVALLE-BRACHO, 2019). A técnica é baseada em PCR multiplex, ou seja, sequenciamento genético do fragmento amplificado para diferentes espécies (HARRIS et al., 1998; SAGI et al., 2017). Mais recentemente, a análise de curva de Melting de alta resolução (qPCR HRM) vem sendo incorporada para auxiliar o diagnóstico (GOMES et al., 2017) e discriminar subgênero e algumas espécies (GALLUZZI et al., 2018; NAMAZI et al., 2021).

Entre os alvos mais utilizados para o diagnóstico da LT, estão diferentes regiões do minicírculo de DNA do cinetoplasto (kDNA), sensibilidade maior que 94% para LT (PIRMEZ et al., 1999; RODRIGUES et al., 2002; ROMERO et al., 2001). Outros alvos como o espaçador interno transcrito 1 (ITS1, *Internal transcribed spacer*), genes da subunidade menor do RNA ribossomal (SSU rRNA, *small subunit ribosomal ribonucleic acid*) também são amplamente utilizados (AL-JAWABREH et al., 2006; MEREDITH et al., 1993; VAN EYS et al., 1992). Com objetivo de identificar espécies de *Leishmania*, a clivagem enzimática de regiões do gene hsp70 com enzima de restrição HaeIII, tem se mostrado capaz de distinguir todas as espécies de *Leishmania* patogênicas circulantes no Brasil (DA SILVA et al., 2010). Entretanto, estas técnicas moleculares são complexas e de alto custo e ainda necessitam de padronização, estando restritas a centros de referência e pesquisa.

Um avanço entre os métodos moleculares foi o desenvolvimento da técnica de amplificação isotérmica de DNA mediada por loop (LAMP, *loop-mediated isothermal amplification*). Trata-se de uma técnica de amplificação isotérmica, realizada entre 60-65°C, que utiliza no mínimo dois pares de iniciadores e o produto da reação pode ser detectado visualmente (NOTOMI et al., 2000). Foi avaliada pela primeira vez para o diagnóstico da LC em 2010, utilizando como alvo DNA ribossômico (rDNA) 18S, tendo apresentado sensibilidade de 94% (ADAMS et al., 2010). A partir deste estudo, outros alvos foram testados, tais como 18S rDNA e kDNA, o que permitiu a produção do kit comercial Loopamp™ *Leishmania*

Detection (Eiken Chemical Co. Tokyo, Japan). Na etapa de validação, o kit apresentou 95% de sensibilidade e 86% de especificidade para o diagnóstico laboratorial da LC (ADAMS et al., 2018), em infecção por *L. guyanensis*. Posteriormente, o desempenho deste kit foi avaliado em pacientes do Suriname e do Afeganistão usando coleta de material por escovado, com sensibilidade e especificidade variando entre 84,8 e 93,4% e entre 42,9 e 94,1%, respectivamente (SCHALLIG et al., 2019; VINK et al., 2018). Com a infecção causada por *L. braziliensis*, até o momento, apenas um estudo avaliou o desempenho do LAMP entre pacientes com a forma cutânea da leishmaniose na Colômbia, com sensibilidade de 100% e especificidade de 91% em comparação com a PCR (LEÓN et al., 2018). Não há dados de desempenho na avaliação diagnóstica da forma mucosa e, no Brasil, ainda não existe nenhum kit comercial baseado na técnica de LAMP.

### 3.3.3.3 Diagnóstico imunológico

Entre os métodos imunológicos, incluem-se a Intradermorreação de Montenegro (IDRM) e testes sorológicos que, em geral, são baseados na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e ensaio de imunoabsorção enzimático (ELISA - *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*). Estes testes seriam, em tese, potencialmente úteis pela resposta humoral observada na leishmaniose com comprometimento mucoso.

A IDRM é um teste de hipersensibilidade tardia, produzida em resposta à inoculação de antígeno total de *Leishmania* spp. na derme do antebraço. O teste é de fácil aplicação e a leitura é realizada após 48 ou 72 horas, considerada positiva quando há uma induração igual ou superior a cinco milímetros (MONTENEGRO, 1926). Segundo observações de algumas séries de casos, o teste possui positividade entre 70 e 100% entre acometidos com a forma mucosa da leishmaniose (OLIVEIRA et al., 2005; SHAW; LAINSON, 1975) podendo se apresentar negativo em pacientes com lesões recentes e em pacientes imunossuprimidos (CUBA et al., 1984). Resultados falso-positivos são observados em indivíduos residentes em áreas com alta transmissão de leishmaniose, pacientes com outras infecções parasitárias, como doença de Chagas e pacientes tratados há mais de um ano (GOMES et al., 2014; GONTIJO; CARVALHO, 2003; REED, 1996; SASSI et al., 1999; SKRABA et al., 2015). De baixo custo e fácil execução, o método vinha auxiliando o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso nos últimos anos, até a interrupção de sua produção em 2015, em função das exigências legais para sua fabricação que não puderam ser alcançadas pelo único laboratório produtor no Brasil (BRAZ, 2019).

A marcante dificuldade de confirmação etiológica entre pacientes com leishmaniose com comprometimento mucoso torna a busca por um marcador sorológico ainda mais justificada (GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012). Apesar da limitação inerente a todo método baseado na pesquisa de anticorpos - não distinguir infecções passadas de doença ativa e nem a exposição a diferentes espécies (BRITO et al., 2000; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; ROMERO, 1998), várias plataformas e antígenos têm sido explorados no diagnóstico das diferentes formas clínicas da leishmaniose tegumentar, com resultados variáveis (BRITO et al., 2000; FREIRE et al., 2021). Uma das grandes dificuldades enfrentadas pelos pesquisadores tem sido a escolha da preparação antigênica ideal para compor os testes sorológicos, considerando a variedade existente de espécies de *Leishmania* e a dificuldade de se identificar antígenos que resultem em alta sensibilidade e especificidade simultaneamente. ZANETTI et al. (2019), em revisão sistemática, observaram que ELISA utilizando antígenos recombinantes mostraram alta sensibilidade (93,8% -100%) e especificidade (82,5-100%), apresentando melhores desempenhos diagnósticos que os ELISA baseados em antígeno solúvel (1-97,4% e 57,5-100%, respectivamente).

Utilizando a metodologia ELISA, BARROSO-FREITAS e colaboradores (2009) avaliaram o desempenho dos antígenos de *L. braziliensis* e *L. major*-like em 20 amostras de pacientes com a forma mucosa (exclusiva e com lesão de pele concomitante) da leishmaniose, e a positividade do ELISA usando o antígeno de *L. braziliensis* foi de 100%, enquanto *L. major*-like, de 75%. JUNQUEIRA PEDRAS e colaboradores (2003), utilizando antígeno solúvel de *L. braziliensis*, também com ELISA, encontraram 95% de sensibilidade e 71% de especificidade em 19 amostras de pacientes com leishmaniose com acometimento mucoso exclusivo.

Atualmente, existe um interesse crescente na identificação e caracterização de antígenos purificados, recombinantes ou até mesmo peptídeos que apresentem propriedades antigênicas e que possam ser utilizados para aumentar a sensibilidade e a especificidade dos testes sorológicos no diagnóstico da LT, recentemente revisados por FREIRE et al., (2021). Visando identificar potenciais candidatos, diferentes metodologias têm sido empregadas, tais como ferramentas de proteômica e imuno-proteômica (DUARTE et al.,

2015a; LIMA et al., 2017), técnicas de exibição de fagos (COSTA et al., 2016) e ferramentas de bioinformática (MENEZES-SOUZA et al., 2014a, 2014b).

### **3.4 Aspectos clínicos da leishmaniose com comprometimento mucoso: tratamento**

Em relação à abordagem terapêutica, de acordo com revisão sistemática realizada por Amato e colaboradores (2007), os antimoniais pentavalentes são as drogas mais utilizadas para o tratamento da leishmaniose com acometimento mucoso nas Américas, seguidos pela anfotericina B e outros medicamentos cuja eficácia descrita e experiência acumulada são significativamente menores, tais como as aminosidinas, azoles, alopurinol e imunoterapia. Segundo esta revisão, a resposta terapêutica aos antimoniatos pentavalente foi de 67%. A comparação de eficácia entre as duas formulações de antimônio, antimoniato de meglumina (AM) e estibugluconato de sódio (SS), este último não disponível no Brasil, revelou diferença significativa (88% para AM *versus* 51% para SS,  $p < 0.05$ ), sendo que todos os estudos que avaliaram a formulação meglumina foram realizados no Brasil, enquanto o estibugluconato foi avaliado no Peru e Panamá. Por sua vez, ainda que faltem estudos prospectivos e comparativos sustentando o uso das formulações lipídicas de anfotericina B para o tratamento das várias apresentações com comprometimento mucoso, o número de relatos de resposta clínica com o uso destes medicamentos vem aumentando, com resultados bastante promissores (CUNHA et al., 2015a; SAMPAIO; MARSDEN, 1997; SANTOS et al., 2019).

A evidência para a combinação de drogas ou o uso de terapia adjuvante no tratamento da leishmaniose com lesão mucosa é ainda limitada. Há alguns anos, MACHADO e colaboradores (2007) demonstraram em ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, que a pentoxifilina, um inibidor do fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), em combinação com AM acelerou significativamente o tempo de cura da doença. Além disso, neste estudo, os pacientes com a doença mucosa que foram tratados com esta combinação apresentaram uma taxa de 100% de cura com um ciclo de tratamento, em comparação com uma taxa de cura de 58% observada no grupo controle.

Experiência clínica com a anfotericina B no tratamento da forma mucosa da leishmaniose vem sendo aumentada nos últimos anos. Existem ao menos duas séries retrospectivas de casos com a forma mucosa tardia no Brasil, reunindo aproximadamente 60 pacientes,

descrevendo taxa de cura com a formulação lipossomal da anfotericina B entre 80 e 93% (CUNHA et al., 2015b; SANTOS et al., 2019).

Em relação às alternativas terapêuticas, a experiência no tratamento da leishmaniose mucosa tardia é ainda mais escassa. Para a miltefosina, taxa de cura foi estimada em 70% na Bolívia (SOTO et al., 2009). Por sua vez, a taxa de cura entre pacientes com lesão nas mucosas e lesões cutâneas concomitantes variou de 58 e 83 (FRANKE et al., 1994; MACHADO; PENNA, 2012; SOTO et al., 2007). No Brasil, um pequeno estudo comparando miltefosina com AM não identificou diferença entre as intervenções, sendo 11 de 12 pacientes que receberam miltefosina foram considerados curados aos seis meses (SAMPAIO et al., 2019). Com poucos casos com comprometimento mucoso reunidos, revisão sistemática realizada por GALVÃO; RABELLO; COTA, (2017) concluíram que não há evidências suficientes para apoiar o uso de terapia azólica para nenhuma forma da LT.

No Brasil, de acordo com o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (BRASIL, 2017), a recomendação como primeira escolha para o tratamento da leishmaniose com acometimento mucoso é o AM em esquema de 20mg/kg/dia por 30 dias, por via intramuscular (IM) ou endovenosa (EV), preferencialmente associado à pentoxifilina na dose de 400 mg, três vezes ao dia durante 30 dias. Porém, o documento com as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil não esclarece se a indicação se aplica a todo paciente com alguma lesão mucosa ou apenas aos casos com doença mucosa exclusiva, como aparentemente é a maior parte dos pacientes avaliados nos estudos originais que sustentam estas recomendações. Salienta-se a toxicidade reconhecida da droga, especialmente pancreática, hepática e cardíaca, esta última a mais letal e agravada e pela frequente presença de comorbidades no grupo de pacientes com idade mais avançada, tipicamente acometido pela forma mucosa isolada da doença. Em função desta toxicidade, os antimoniais são contraindicados em gestantes, pacientes com idade acima dos 50 anos, transplantados e com cardiopatias, nefropatias, hepatopatias, além de pacientes que façam uso crônico de medicamentos que prolonguem o intervalo QTc (BRASIL, 2017). São todas condições reconhecidas no Brasil como indicações para o uso de anfotericina B lipossomal. O protocolo recomendado é 3-4 mg/kg/dia por infusão venosa, em dose única diária, sem limite de dose máxima diária até atingir a dose total de 30 a 40 mg/kg (BRASIL, 2017). Pela escassez de evidência científica reunida até agora, apesar de contar com aprovação da

Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde (CONITEC) (BRASIL, 2018), ter sido recentemente incorporada no Brasil para o tratamento de qualquer forma de leishmaniose tegumentar, a miltefosina ainda não está listada no guia terapêutico do Ministério da Saúde como uma das opções de primeira linha para tratamento da forma mucosa da leishmaniose.

### **3.5 Diferentes classificações para leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso**

O acometimento mucoso na leishmaniose tegumentar pode se manifestar com diferentes apresentações clínicas. O quadro clássico é a presença de lesão nasal isolada, ocorrendo anos após a doença cutânea. Entretanto, formas clínicas nas quais lesão de pele está presente, de forma concomitante à lesão em mucosa, contígua ou não, também integram o espectro clínico da doença com acometimento mucoso. Esta ampla gama de apresentações não é discutida ou diferenciada nos manuais de recomendação de manejo da doença, nem nos sistemas de notificação e vigilância epidemiológica, apesar da existência de várias tentativas de classificação da forma mucosa de leishmaniose, apresentadas a seguir.

Sem atrelar a um manejo clínico específico, a classificação adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil (MS) (BRASIL, 2017) é clínica e divide os casos com acometimento mucoso de acordo com sua evolução temporal, tendo como referência a lesão cutânea, sua localização e cronologia do surgimento de lesões, informações muitas vezes indisponíveis. Ainda assim, as seguintes definições são apresentadas no guia produzido pelo MS do Brasil:

- **Forma mucosa tardia:** forma mais comum da doença, pode surgir até vários anos após a cicatrização da forma cutânea sendo, frequentemente, relacionada à existência de lesões cutâneas múltiplas e de longa duração, que curam espontaneamente ou que foram tratadas de forma insuficiente.
- **Forma mucosa sem lesão cutânea prévia:** quando a lesão mucosa se apresenta clinicamente isolada, sem evidências da ocorrência de lesões cutâneas prévias. Este quadro pode estar associado à existência de lesões pequenas com pouco destaque, sem deixar cicatrizes perceptíveis.
- **Forma mucosa concomitante:** quando se tem, ao mesmo tempo, lesões não contíguas dos tipos cutânea e mucosa.

- **Forma mucosa contígua:** decorrente da evolução direta da lesão cutânea, podendo estar ou não apresentando sinais de atividade no momento do diagnóstico.
- **Forma mucosa primária:** decorrente da picada direta do vetor nas mucosas do paciente.

Outras classificações se baseiam no aspecto histológico, avaliando extensão e intensidade da inflamação tecidual (FRANKE et al., 1990; GUERREIRO et al., 2000). De modo geral, são classificações pouco úteis na abordagem do paciente, pela grande sobreposição entre as várias apresentações clínicas, ausência de correlação prognóstica e dificuldade de operacionalização de seu uso. Seguem quatro propostas de classificação já elaboradas:

A primeira foi proposta por AZULAY (1960) e se baseava na premissa de que a fase inicial da doença era caracterizada histopatologicamente por processo exsudativo agudo e que, na fase tardia, surgia granulomas tuberculóides:

- *Inflamação exudativa aguda;*
- *Inflamação predominantemente histiocitária;*
- *Inflamação histiocitolifocitária difusa com nichos epitelióides;*
- *Inflamação histiócito-linfócito-plasmocitária;*
- *Granuloma gigantocitário;*
- *Granuloma tuberculóide;*
- *Granuloma histiocitário lepromatóide.*

Em 1980, RIDLEY e colaboradores apresentaram outra classificação histológica aplicável para as formas cutânea e mucosa da leishmaniose, incluindo cinco padrões distintos:

- *Grupo I: Derme quase normal, exceto pela presença das manchas de degeneração de colágeno;*
- *Grupo II: Processo necrotizante mais grave que no grupo I;*
- *Grupo III: Infiltrado inflamatório acentuado sem necrose ou granuloma;*
- *Grupo IV e V: Presença de células epitelióides e células gigantes.*

Posteriormente, a partir de um estudo histopatológico de 162 pacientes procedentes da Bahia com comprometimento cutâneo e mucoso por leishmaniose, MAGALHÃES e

colaboradores (1986) propuseram uma classificação histológica baseada nas características morfológicas e possível correlação clínico-evolutiva da doença:

- *Reação exsudativa celular: infiltrado histioplasmocitário com proporções celulares que tendem para a equivalência;*
- *Reação exsudativa e necrótica: necrose tissular de amplitude e forma variáveis, associada à vasculite aguda, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;*
- *Reação exsudativa e necrótico-granulomatosa: reação granulomatosa desorganizada nas proximidades de área de necrose tissular, com vasculite aguda menos frequente, no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;*
- *Reação exsudativa e granulomatosa: reação granulomatosa desorganizada isolada no seio do infiltrado histiolinfoplasmocitário;*
- *Reação exsudativa e tuberculóide: reação granulomatosa epitelióide organizada em tubérculos no centro do infiltrado histiolinfoplasmocitário.*

Em 1991, BITTENCOURT e BARRAL, a partir das classificações de Ridley (1980) e Magalhães (1986), propuseram uma classificação simplificada, resumida em três padrões histológicos:

- *I. Infiltrado inflamatório de células plasmáticas, linfócitos e macrófagos e, ausência de células epitelióides gigantes;*
- *II. Presença de células gigantes e/ou epitelióides, em associação a infiltrado inflamatório;*
- *III. Presença de granuloma bem circunscrito com células epitelióides ou gigantes, associado ou não aos outros dois padrões.*

Neste trabalho, os autores concluem que os padrões histopatológicos não representam estágios evolutivos da LT, não podendo, dessa forma, ser correlacionados com o prognóstico e a resposta ao tratamento, como até então se defendia.

Com ênfase nas manifestações clínicas e buscando identificar marcadores prognósticos, novas classificações foram propostas com o objetivo de harmonizar definições em estudos clínicos. Em 1997, LLANOS-CUENTAS e colaboradores propuseram estratificação da

leishmaniose com comprometimento mucoso isolado tardio em três grupos de gravidade baseada na combinação de localização das lesões e intensidade de sintomas, descrita a seguir:

- *Forma leve: quando o acometimento é exclusivamente nasal;*
- *Forma moderada: quando outra mucosa, além da nasal, está acometida, sendo os sintomas odinofagia, disfonia e dispneia são leves;*
- *Forma grave: quando outra mucosa, além da nasal, está acometida e os sintomas odinofagia, disfonia e dispneia são considerados intensos.*

Por sua vez, a grande limitação desta classificação é não ser aplicável para a doença sem comprometimento nasal. Por fim, existe ainda a classificação baseada na extensão e no tipo de acometimento mucoso observado ao exame otorrinolaringológico, proposto por LESSA e colaboradores (2012).

- ***Nodulação sem ulcerações:*** doença no estágio I, na qual os pacientes podem ser assintomáticos ou apresentar sintomas discretos, como coriza sanguinolenta ou eventual obstrução nasal;
- ***Ulcerações superficiais:*** doença no estágio II, na qual os pacientes podem se queixar de rinorreia sanguinolenta e obstrução nasal;
- ***Ulcerações profundas:*** doença no estágio III, na qual os pacientes podem se queixar de sensação dolorosa na pirâmide nasal. Rinorreia sanguinolenta, descarga de coágulos sanguíneos e obstrução nasal são comuns nesta fase da doença. Em alguns casos, a infiltração edematosa da pirâmide nasal pode ser observada;
- ***Perfuração septal:*** doença no estágio IV, na qual os pacientes podem se queixar de rinorreia sanguinolenta, de descarga de coágulos sanguíneos e obstrução nasal;
- ***Destruição da arquitetura nasal e alteração de estruturas faciais:*** doença no estágio V, na qual os pacientes apresentam processo inflamatório intenso, onde a subsequente destruição de tecidos pode interferir com a estrutura facial de forma significativa. Além de rinorreia sanguinolenta, da descarga de coágulos sanguíneos e obstrução nasal, o paciente pode apresentar destruição da arquitetura nasal.

Em síntese, as tentativas de classificação da leishmaniose com acometimento mucoso até agora propostas não alcançaram êxito em auxiliar na abordagem dos pacientes, seja do ponto de vista diagnóstico ou terapêutico, seja para subsidiar avaliação prognóstica. Além disso, a inexistência de uma classificação padronizada e amplamente aceita impede a comparação de dados epidemiológicos e de estudos, prejudicando a construção da evidência necessária para orientar o manejo da doença. Da mesma forma, possíveis especificidades de cada uma das várias formas clínicas de LT com comprometimento mucoso, em termos de comportamento frente às ferramentas diagnósticas, resposta aos diferentes tratamentos e prognóstico, não vêm sendo contempladas nas recomendações oficiais de manejo clínico, possivelmente contribuindo para o agravamento da morbidade da doença.

## **4 METODOLOGIA**

Para alcançar os objetivos deste estudo foram realizadas duas abordagens metodológicas. Tendo como base os dados obtidos de pacientes com suspeita de leishmaniose e comprometimento mucoso, recrutados em um estudo de coorte, essa tese é composta por duas partes:

**Parte I: avaliação das diferentes apresentações clínicas de leishmaniose tegumentar com comprometimento mucoso e seus aspectos demográficos, diagnósticos e prognósticos.**

**Parte II: avaliação da acurácia de novas estratégias diagnósticas para leishmaniose com comprometimento mucoso.**

### **4.1 Tipo de estudo**

Este estudo representa a primeira análise transversal de uma coorte de pacientes com leishmaniose com acometimento mucoso, em curso desde 2017, no Centro de Referência em Leishmaniose do Instituto René Rachou (CRL-IRR). Esta análise tem seu limite temporal compreendido entre a data de entrada na coorte até 360 dias após a data inicial do tratamento, para casos com confirmação de leishmaniose, ou data de alta do serviço, no caso de acometimento mucoso por outras etiologias.

### **4.2 Aprovação ética**

O estudo clínico observacional com população alvo pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar com acometimento mucoso intitulado “Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira”, CAAE 63259316.5.0000.5091, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou, número do Parecer: 1.957.508 (ANEXO I). Os pacientes foram incluídos exclusivamente após consentimento formal documentado (ANEXO II, III, IV e V).

### **4.3 Local do estudo**

Ambulatório Alda Lima Falcão do CRL-IRR, Referência Técnica Nacional em Leishmaniose Tegumentar, integrada ao Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil. Trata-se de um serviço da Fundação Oswaldo Cruz em Minas Gerais, Fiocruz Minas, que tem

como missão desenvolver processos e produtos, visando apoiar ações de controle das leishmanioses nas três esferas de governo, por meio de atendimento ambulatorial, capacitação, pesquisa e assessoramento. O ambulatório realiza em torno de 1.000 atendimentos médicos e notifica aproximadamente 120 casos de leishmaniose, anualmente. São realizados em torno de 300 exames/ano, incluindo pesquisa direta, cultivo e teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp.

#### **4.4 Recrutamento para coorte**

Desde 17 de abril de 2017, todos os pacientes atendidos no CRL-IRR com acometimento de alguma superfície mucosa e suspeita clínica de leishmaniose (n=140) foram convidados a participar do estudo, independentemente de já terem recebido diagnóstico ou tratamento prévio para leishmaniose.

##### **4.4.1 Critérios de inclusão nesta análise transversal**

Dentre os casos incluídos na coorte, utilizou-se como critério de seleção para o presente estudo:

1. ter recebido diagnóstico definitivo da condição responsável pelo acometimento mucoso, firmado em prontuário médico do CRL-IRR, seja leishmaniose ou outra doença;
2. para casos confirmados para leishmaniose, ter ao menos uma avaliação de seguimento após tratamento.

#### **4.5 Definição de caso de leishmaniose entre participantes com comprometimento mucoso**

Foram considerados casos de leishmaniose, pacientes com lesão mucosa ativa associada a uma das duas situações abaixo:

- A. Confirmação da infecção por *Leishmania* spp., por meio de: *i*) identificação de amastigotas pelo exame parasitológico direto ou no exame histológico, *ii*) identificação de promastigotas em cultivo, *iii*) pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. positiva por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tecido mucoso afetado ou em fragmento de lesão cutânea concomitante ativa OU
- B. Quadro clínico-epidemiológico compatível com leishmaniose, acompanhado por resposta terapêutica completa anti-*Leishmania*, afastados outros diagnósticos para a condição.

#### **4.6 Abordagem de casos suspeitos de leishmaniose com acometimento mucoso, segundo protocolo do CRL-IRR**

São considerados casos suspeitos de leishmaniose pacientes que apresentam lesão(ões) em mucosa(s) persistente(s) por quatro ou mais semanas – enantema, infiltração, crostas, pontos sangrantes, erosão, ulceração com/sem fundo granuloso, perfuração de septo nasal – acompanhadas ou não de sinais e/ou sintomas como obstrução nasal, eliminação de crostas, epistaxe, disfagia, odinofagia, rouquidão, dispneia, tosse, prurido nasal e/ou dor local. Após avaliação clínica inicial no CRL-IRR, os pacientes são encaminhados ao ambulatório de otorrinolaringologia do Hospital São Geraldo (UFMG) para avaliação otorrinolaringológica completa padronizada (ANEXO VI) e biópsia da mucosa. Os fragmentos retirados da lesão são encaminhados ao CRL-IRR, devidamente acondicionados, para a realização dos exames: PCR para identificação de DNA de *Leishmania* spp., cultivo para fungos e exame histopatológico. Pela alta taxa de contaminação da cultura e baixíssimo rendimento do exame direto para *Leishmania* em fragmento mucoso, exame direto e cultura para *Leishmania* spp. não fazem parte da investigação rotineira de lesões mucosas no CRL-IRR.

Quando o paciente apresenta também acometimento cutâneo, biópsia com extração de fragmento de pele para realização de *imprint* e aspirado de lesão são também realizados, sempre que a localização da lesão cutânea permita.

Além de investigação direcionada para leishmaniose, pacientes com acometimento mucoso são avaliados rotineiramente por investigação complementar: sorologia para HIV (imunocromatografia), paracoccidiodomicose (imunodifusão dupla) e sífilis (teste treponêmico imunocromatográfico); além de marcadores de granulomatose de Wegener (ANCA p e c) e cultivo de fragmento de biópsia mucosa para crescimento de fungos.

A confirmação de leishmaniose é estabelecida pela detecção de DNA de *Leishmania* spp. por PCR convencional, com alvo kDNA, ou visualização de parasitos pelo exame direto ou exame histopatológico. Excepcionalmente, os pacientes podem receber tratamento específico pela suspeição clínico-epidemiológica. Este procedimento é adotado quando a investigação diagnóstica se mostra negativa após duas biópsias mucosas, e é esgotada a propedêutica específica para outras etiologias.

Após o diagnóstico e a notificação ao SINAN, o tratamento segue as recomendações vigentes do Ministério da Saúde do Brasil: *a.* Antimoniato de meglumina (AM) por via endovenosa, na dose de 20mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia, associado à pentoxifilina na dose de 400mg, três vezes ao dia, por 30 dias; *b.* anfotericina B lipossomal endovenosa, para casos com contraindicação ao AM sistêmico, na dose de 3mg a 4 mg/Kg/dia, em dose única diária, até a dose total acumulada de 30mg/Kg. Na impossibilidade de uso da anfotericina B lipossomal, medicamentos de segunda escolha podem ser utilizados: desoxicolato de anfotericina B 0,7mg a 1mg/Kg/dia diariamente ou em dias alternados, sendo a dose total acumulada de 25mg a 40mg/Kg; miltefosina, por via oral, na dose de 50mg de 2 a 3 vezes ao dia, por 28 dias. Casos com confirmação etiológica de *L. guyanensis* são tratados com isetionato de pentamidina na dose de 4mg/Kg/dia, a cada 72 horas, 5 a 10 doses.

No CRL-IRR, excepcionalmente, para pacientes acima de 80 anos, com condição clínica debilitada por outras doenças não controladas ou com comorbidades que tornam o tratamento disponível para leishmaniose contraindicado ou de risco, tentativa de terapia de segunda linha com objetivo de redução de sintomas, com fluconazol (6-8 mg/kg/dia, via oral), é realizada por tempo indefinido (PEDRAS et al., 2018). Em alguns casos de doença mucosa oligo-sintomática e presença de outras condições clínicas descompensadas, a decisão conjunta da equipe assistencial e família pode ser não oferecer tratamento específico para leishmaniose.

#### **4.7 Desfechos clínicos avaliados após o tratamento de leishmaniose**

De acordo com protocolo do serviço, aos 90 dias ( $\pm 15$  dias) e 180 dias ( $\pm 4$  semanas) a partir da data de início do tratamento, todos os pacientes são avaliados para definição de resposta clínica. Após o estabelecimento de cura, realiza-se avaliação clínica anual, por cinco anos. Para a sistematização do exame otorrinolaringológico, o serviço instituiu formulário padronizado para registro do exame das cavidades nasal, oral e vias aéreas altas (ANEXO VI). Baseado em um esquema numérico que gradua a localização, a extensão e o tipo de acometimento mucoso, que varia desde enantema e infiltração até a presença de erosão/ulceração e perfuração de septo nasal, é possível produzir um resultado numérico que melhor expresse a situação do paciente. Nas avaliações subsequentes ao tratamento, além da informação da condição da mucosa, sob os aspectos descritos acima, a equipe assistencial indica a opção que melhor descreve a evolução do quadro clínico, que pode ser inalterado, melhora parcial/resolução completa ou piora.

Segundo protocolo do CRL-IRR, o desfecho cura da leishmaniose com comprometimento mucoso é avaliado aos 180 dias do início do tratamento (D180) e requer ausência de qualquer atividade da doença. Entre o término do tratamento até D180, a verificação de piora do acometimento mucoso, segundo os critérios de avaliação adotados (extensão ou intensidade do dano mucoso), indica falha terapêutica. O tratamento de resgate é escolhido de acordo com as especificidades de cada paciente.

#### **4.8 Métodos diagnósticos utilizados para confirmação infecção por *Leishmania* spp.**

##### **4.8.1 Procedimentos para obtenção das amostras**

###### **4.8.1.1 Biópsia da lesão de pele**

Pacientes com lesão ativa de pele concomitante à lesão mucosa são avaliados por biópsia de pele após antissepsia da área com solução de clorexidina 4% e infiltração local do anestésico lidocaína a 2%. A retirada de dois fragmentos cilíndricos é realizada com instrumento *punch* de calibre 5, na borda da lesão e em movimento de rotação. Os fragmentos são seccionados ao meio e suavemente pressionados em papel filtro para a eliminação de sangue e secreção. Os fragmentos seccionados são utilizados para a realização do *imprint* e, a seguir, acondicionados para a realização de cultivo para fungos (fragmento acondicionado em soro fisiológico), PCR para *Leishmania* spp. (fragmento acondicionado a seco) e exame histológico (fragmento acondicionado em formol a 10%). Segundo o protocolo do CRL-IRR, com o racional de melhor utilização dos recursos, para o espécime pele, aguarda-se a leitura do *imprint*, se negativa para *Leishmania* spp., os fragmentos acima discriminados são encaminhados para realização de PCR, cultivo de fungo e exame histológico.

###### **4.8.1.2 Biópsia da lesão mucosa**

Biópsias em mucosa dos tratos respiratório e digestivo altos (lábios, língua, paredes laterais, superior e posterior, incluindo palatos duro, mole, úvula e faringe) e mucosa nasal (esta última com auxílio do espéculo nasal) são realizadas no Hospital São Geraldo, unidade do Hospital das Clínicas UFMG. O procedimento é executado por médico otorrinolaringologista, utilizando pinça em saca bocado, após limpeza da mucosa com gaze embebida em soro fisiológico e remoção de crostas, seguido por infiltração local de xilocaína a 2%. São habitualmente coletados três fragmentos de mucosa: um primeiro é

condicionado em frasco seco, para a realização da pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. por PCR, outro em frasco com salina estéril para cultura para fungo e, um terceiro fragmento é colocado em frasco com formol a 10% para a execução do exame histológico.

#### **4.8.1.3 Aspirado da borda da lesão**

O aspirado de lesão em sistema fechado para cultivo para *Leishmania* spp. é um procedimento padronizado para investigação de lesão localizada na pele e consiste em aspiração, a partir da borda da lesão com agulha acoplada a tubo de ensaio contendo dois mililitros de meio de cultivo específico para *Leishmania* (descrito no item 5.7.3.b). O tubo com meio de cultivo tem, previamente ao procedimento, ar removido com seringa de 20 mL para a produção de vácuo. O procedimento de coleta é realizado com a introdução da agulha acoplada em tubo de meio de cultura em pele íntegra, de forma tangencial à borda da lesão. Após o encaixe do tubo com meio de cultivo à agulha, o conjunto é retraído de forma que o vácuo no tubo gera a aspiração de gotículas de secreção do subcutâneo em torno da lesão durante o trajeto percorrido pela agulha. O procedimento é repetido três vezes.

### **4.9. Métodos laboratoriais para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar, de acordo com o protocolo do CRL-IRR**

#### **4.9.1 *Imprint***

Consiste na impressão do fragmento de pele biopsiado em lâmina de vidro, realizada imediatamente após a biópsia da lesão, sendo o material fixado com metanol e corado com *Giemsa*. A leitura das lâminas se dá por exame em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão com aumento de 100 vezes. A identificação de amastigotas, estruturas ovaladas caracterizadas pela presença de membrana citoplasmática, núcleo e cinetoplasto, confirma a infecção por *Leishmania* spp.

#### **4.9.2 Cultivo de aspirado de lesão de pele para detecção de *Leishmania* spp.**

Realizado a partir do conteúdo aspirado das lesões, como descrito no item 4.8.1.3. O meio de cultivo é o NNN (McNeal, Novy, Nicolle), enriquecido com salina/antibiótico penicilina estreptomicina (GIBCO® 15140-122). Os tubos de cultivo são incubados por 21 dias em estufa, a 26°C. Amostras do meio de cultivo são analisadas por microscopia ótica

semanalmente, até três semanas. A presença de formas promastigotas de *Leishmania* spp. indica a positividade do método.

#### **4.9.3 Exame histológico**

Exame executado por laboratório contratado (processo 162/2015-26, contrato 15/2015, Laboratório Tafuri Anatomia Patológica, Belo Horizonte). Realizado a partir de fragmento de pele ou mucosa fixado em formol a 10%. Após fixação em formol, são realizadas as etapas de processamento do material, quais sejam desidratação, diafanização e impregnação, seguidas por inclusão em parafina, corte por microtomia e coloração. A coloração inicial é por Hematoxilina & Eosina (HE), podendo ser acrescida por colorações especiais para pesquisa de fungos (PAS, Gomori) e bacilo álcool-ácido resistentes (Ziehl-Neelsen), se indicado por suspeita clínica. As lâminas são então inspecionadas em microscopia óptica em diversos aumentos. O diagnóstico de leishmaniose é firmado quando estruturas amastigotas são visualizadas no tecido. O exame histológico pode revelar presença de infiltrado inflamatório inespecífico, não suficiente para a confirmação de leishmaniose. A visualização de agentes etiológicos específicos, tais como fungo ou micobactérias, ou infiltrado por células neoplásicas é considerado critério para a confirmação ou investigação complementar diagnóstica de outras etiologias.

#### **4.9.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativo com alvo gênico DNA de cinetoplasto (kDNA)**

O exame está padronizado para execução em fragmento de pele ou mucosa. A reação se inicia com extração do DNA dos fragmentos de tecido, utilizando-se o kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo protocolo do fabricante. Para a PCR qualitativa com alvo gênico DNA de cinetoplasto (kDNA), a reação é realizada usando os seguintes iniciadores gênero-específicos de *Leishmania*: (i) um iniciador senso 150 (5'-GGGG / TAGGGGCGTTCTC / GCGAA-3'); (ii) um iniciador antisenso 152 (3'-C / GC / GC / GA / TCTATA / TTTACACCAACCCC-5') direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* spp., gerando um produto de 120 pares de base (pb) (DEGRAVE et al., 1994). A PCR é realizada em um volume total de 25 µL contendo 0,75 U de Taq DNA polimerase em Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, solução MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,4 mM de cada nucleotídeo (Promega Corp., Madison, WI, EUA), 0,6 µM de cada iniciador (Integrated DNA Technologies, Iowa, EUA)

e 10 ng de amostra de DNA. As condições utilizadas na reação são desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 34 ciclos de amplificação a 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 5 min. O equipamento utilizado é o termociclador ProFlex™ (Applied Biosystems/Thermo Fischer Scientific, EUA). Cada ensaio inclui dois controles da PCR (controle negativo: mix da PCR sem o DNA e controle positivo: DNA de *L. braziliensis*, cepa MHOM/Br/75/M/2903 extraído de cultura). Como controle do procedimento de extração de DNA e de amplificação, todas as amostras são amplificadas para o gene humano codificador da  $\beta$ -actina utilizando iniciadores Aco1 (5'-ACCTCATGAAGATCCTCACC-3') marcado com biotina-5' e Aco2 (5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCC-3'), que geram um produto de 120 pares de base, visualizado em gel de poliacrilamida 6% corados com nitrato de prata.

#### **4.9.5 Identificação da espécie de *Leishmania***

Realizada no CRL-IRR em situações específicas: a. pacientes com história epidemiológica sugestiva de aquisição da infecção em estados da região amazônica; b. pacientes com manifestações cutâneo-mucosas atípicas; c. pacientes com manifestações de leishmaniose visceral (LV) concomitante a manifestações cutâneo-mucosas. A identificação de espécies de *Leishmania*, nas amostras de fragmento de biópsia, padronizada no CRL-IRR é a técnica de PCR-RFLP hsp70 (adaptado de (GRAÇA et al., 2012). A reação de PCR foi realizada em um volume total de 25  $\mu$ L, incluindo 10-50 ng de DNA molde, 2 U da enzima Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tampão para PCR 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 e KCl 500 mM), 0,4  $\mu$ M de cada iniciador hsp70 (senso 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e anti-senso 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3'), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,2 mM dNTPs (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). O protocolo de ciclagem consiste em uma etapa de desnaturação a 94 °C por 4 min, seguida por 33 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min é realizada. Para a análise de RFLP, as enzimas de restrição *HaeIII* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e *BstUI* (Bio Labs, Nova Inglaterra) são usadas em reações independentes, de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de restrição obtidos são visualizados em géis de poliacrilamida 6%, corados com nitrato de prata, conforme descrito no item anterior. São utilizadas as seguintes cepas referências de DNA de *Leishmania* spp.: *L. braziliensis* (M2903), *L. guyanensis* (M4147), *L. naiffi* (M5533), *L. amazonensis* (PH8) e *L. infantum* (PP75).

#### 4.10 Condução do estudo

O estudo compreendeu quatro etapas: 1. Identificação dos casos elegíveis (definidos em 4.4.1) utilizando a planilha de recrutamento da coorte em leishmaniose com comprometimento mucoso (Projeto CAAE 63259316.5.0000.5091); 2. Revisão de prontuários para conferência dos critérios de elegibilidade e coleta de dados demográficos, clínicos, laboratoriais, tipo de tratamento recebido e evolução clínica (QUADRO 2); 3. Anonimização e codificação dos espécimes clínicos armazenados dos pacientes incluídos neste estudo (soro, DNA extraído e tecido em parafina); 4. execução de testes diagnósticos em avaliação neste estudo (cinco testes de detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp., exame IHQ com anticorpo monoclonal e três métodos de detecção de DNA do parasito).

#### Quadro 2. Definições adotadas e categorias para as variáveis explicativas neste estudo

Variável	Descrição/categorias
Características demográficas	
Escolaridade	Analfabeto, fundamental I e II, ensino médio, ensino superior (completo ou incompleto).
Local de residência	BH/região metropolitana de BH, interior de Minas, demais estados.
Características clínicas	
História prévia de LC	Cicatriz na pele compatível com leishmaniose: tipicamente cicatriz atrófica e hipocrômica, às vezes hipertrófica e com hiperpigmentação.  Sim, não.  Tratamento para LC: sim, não.
Leishmaniose disseminada (critério operacional adotado no CRL-IRR)	Presença de mais que seis lesões de pele.  Sim, não.

Doença reumatológica	Diagnóstico referido ou confirmado de doença reumatológica ou do colágeno ou autoimune, inclui lúpus, artrite reumatóide, espondilite anquilosante, vasculites sistêmicas, espondiloartropatias soronegativas, dentre outras, independente do uso regular de tratamento medicamentoso.
Doença hepática	Diagnóstico referido ou confirmado de cirrose ou hepatopatia crônica.
Doença pulmonar	Diagnóstico referido ou confirmado de pneumopatia crônica: asma, doença pulmonar obstrutiva, fibrose pulmonar, bronquiectasia.
Doença cardíaca	Diagnóstico referido ou confirmado de cardiopatia seja arritmia ou doença valvar, coronariana ou miocárdica, inclui insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência coronariana, disfunção valvar, anormalidade elétrica como fibrilação/flutter atrial, bloqueios de condução, dentre outros.
Classificação LLANOS-CUENTAS (1997)	Leve: acometimento exclusivamente nasal.  Moderada: quando outra mucosa, além da nasal, está acometida, sendo os sintomas odinofagia, disfonia e dispneia leves.  Grave: quando outra mucosa, além da nasal, está acometida e os sintomas odinofagia, disfonia e dispneia são considerados intensos.
Presença acometimento mucoso contíguo à lesão de pele	Ao menos uma lesão de pele é contígua à mucosa.  Sim, não.
Doença restrita ao nariz	Mucosa nasal exclusiva com ou sem lesão em superfície externa (pele) do nariz.  Sim/não.

Tipo de entrada	<p>Caso novo: Indivíduo que nunca recebeu tratamento para leishmaniose com comprometimento mucoso ou, mesmo após tratamento, não houve cura da lesão, independente do tempo de aparecimento da lesão.</p> <p>Recidiva: indivíduo que recebeu tratamento específico para leishmaniose foi considerado curado e, após cura, houve ressurgimento da lesão.</p> <p>Sim/não.</p>
Presença de condição imunodebilitante	<p>Consideradas: infecção pelo HIV, uso de terapia com corticoide ou outro imunossupressor.</p> <p>Sim, não.</p>
Uso regular de bebida alcoólica	<p>Qualquer resposta afirmativa para consumo regular de álcool, não quantificado.</p> <p>Sim, não.</p>
Tratamento completo	<p>Uso de 80% ou mais das doses prescritas.</p> <p>Sim, não.</p>

Fonte: elaborado pela autora.

#### **4.11 Avaliação de métodos para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso**

Diante da inexistência de teste diagnóstico acurado e acessível para o diagnóstico da leishmaniose com comprometimento mucoso, um dos objetivos da coorte é a reunião de amostra bem caracterizada de casos e não casos de leishmaniose para a avaliação de desempenho de novos testes diagnósticos.

Para atender a este objetivo, testes que não fazem parte da rotina de investigação de leishmaniose já implantada no CRL-IRR foram selecionados para análise de acurácia: cinco testes sorológicos: dois ELISA comerciais, um ELISA *in house* de antígeno solúvel bruto de *L. braziliensis* e dois ELISA *in house* de antígeno de proteína recombinante (*L. braziliensis* e *L. infantum*); um novo anticorpo monoclonal IHQ e três técnicas de detecção

de DNA de *Leishmania* spp: duas técnicas de reação em cadeia em tempo real (sistemas de detecção SYBER para alvo kDNA e sistema de detecção TaqMan para o alvo SSU rRNA) e uma técnica de PCR convencional para o alvo hsp70.

A avaliação do desempenho dos testes selecionados (testes índice) foi realizada seguindo os princípios estabelecidos pela convenção STARD (*Reporting Diagnostic accuracy studies*) (COHEN et al., 2016), que estabelece os principais aspectos a serem observados para garantir a completude e a transparência das análises em estudos de acurácia. No Quadro 3 estão descritas algumas definições adotadas, segundo a convenção STARD.

### Quadro 3. Definições adotadas na análise segundo as exigências da convenção STARD

Condição de interesse	Leishmaniose com acometimento mucoso
Teste de referência (critério clínico-laboratorial composto)	<p>Presença de um dos critérios em um paciente com lesão ativa em mucosa:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presença de <i>Leishmania</i> identificada em exame de PCR ou no exame direto, cultura ou tecido (exame histológico);</li> <li>1. Diagnóstico clínico-epidemiológico associado a prova terapêutica positiva para leishmaniose.</li> </ol>
Testes índices (testes em avaliação)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ELISA comercial VIRCELL® (IgG+IgM) baseado em antígeno de <i>L. infantum</i>;</li> <li>2. ELISA comercial SERION (IgG) baseado em antígeno de <i>Leishmania</i> spp;</li> <li>3. ELISA <i>in house</i> de antígeno solúvel bruto de <i>L. braziliensis</i>;</li> <li>4. ELISA <i>in house</i> de antígeno de proteína recombinante e LiHyV de <i>L. infantum</i>;</li> <li>5. ELISA <i>in house</i> de antígeno de proteína recombinante <math>\beta</math>-tubulina de <i>L. braziliensis</i>;</li> <li>6. Anticorpo monoclonal para imuno-histoquímica detecção de <i>Leishmania</i> spp.;</li> <li>7. Reação em cadeia em tempo real (sistemas SYBER) para alvo kDNA;</li> <li>8. Reação em cadeia em tempo real (sistema TaqMan) para o alvo SSU rRNA;</li> </ol>

	9. Técnica de PCR convencional para o gene alvo hsp70.
População testada (critério de seleção da amostra)	Pacientes sintomáticos com alteração detectada em mucosa, recrutados consecutivamente em ambulatório de referência para leishmaniose.
Amostra para análise dos testes sorológicos	Casos: 102 soros de pacientes com leishmaniose mucosa confirmada.  Não-casos: incluiu soros de 24 pacientes com confirmação de outra etiologia (não leishmaniose) para a lesão em mucosa e 69 soros imunes para dengue, zika, hepatites, sífilis, ou de indivíduos saudáveis residentes em BH.
Amostra para análise dos testes moleculares	Casos: 69 fragmentos de mucosa de pacientes com leishmaniose mucosa confirmada.  Não-casos: 14 fragmentos de mucosa de pacientes com confirmação de outra etiologia (não leishmaniose) para a lesão em mucosa.
Amostra para análise do teste imuno-histoquímico	Casos: 44 fragmentos de tecido mucoso de pacientes com leishmaniose mucosa confirmada  Não-casos: 10 fragmentos de tecido mucoso de pacientes com confirmação de outra etiologia (não leishmaniose) para a lesão em mucosa
Execução dos testes	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. O teste de referência foi realizado antes dos testes índice (oportunamente com a abordagem clínica no âmbito da assistência).</li> <li>2. Os testes índice foram realizados em uma mesma oportunidade em amostras codificadas, por um único examinador (cego para a condição clínica e para o resultado dos outros testes) e em duplicata, no período de dezembro de 2020 a maio de 2021, que</li> </ol>

	<p>corresponde a um intervalo entre 3 e 4 anos após a realização do teste de referência, usando espécimes clínicos armazenados (soro, alíquota de DNA já extraído e mantido congelado a -20oC, fragmento de tecido parafinizado).</p>
Medidas de desempenho	<p>Sensibilidade: proporção de participantes com a condição de interesse que possuem o teste índice positivo.</p> <p>Especificidade: proporção de participantes sem a condição de interesse que possuem o teste índice negativo.</p> <p>Acurácia: proporção de todos os testes corretos (soma dos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos), sobre todos os resultados obtidos x 100.</p>
Manejo de resultados indeterminados	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Todos os casos com resultados indeterminados são incluídos no denominador (total de casos testados) e excluídos do numerador de casos positivos (no cálculo de sensibilidade);</li> <li>2. Todos os casos com resultados indeterminados são incluídos no denominador (total de casos testados) e excluídos do numerador de casos negativos (no cálculo de especificidade).</li> </ol>

Fonte: elaborado pela autora

#### 4.11.1 Detecção de anticorpos específicos

A seleção dos testes sorológicos em imunoensaio (ELISA) a terem sua acurácia testada no diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso baseou-se em resultados de estudo realizado previamente por nosso grupo (OLIVEIRA, 2018). Neste estudo, diferentes testes sorológicos foram avaliados em painel de soro de casos com a forma mucosa de leishmaniose, reunidos ao longo dos últimos anos e identificados retrospectivamente. Os

testes ELISA apresentaram o melhor desempenho em comparação com os testes baseados nas plataformas de imunofluorescência e imunocromatografia. Entre os ELISA comparados, o teste Ridascreen® *Leishmania* Ab apresentou maior sensibilidade. Entretanto, este teste não estava mais disponível para compra, apesar de inúmeras tentativas realizadas desde 2019. Diante disto, dois outros kits ELISA produzidos com antígenos de *Leishmania* spp. comercialmente disponíveis no Brasil, nomeadamente o teste VIRCELL® - *Leishmania* ELISA IgG+IgM e o teste Virion/Serion - SERION® ELISA classic *Leishmania* IgG, foram selecionados e adquiridos para esta análise. Para ampliar o painel de testes a serem avaliados, com base nos resultados de revisão sistemática da literatura (FREIRE et al., 2021), identificamos ainda dois testes ELISA *in house* utilizando proteína recombinante (uma de *L. infantum* e outra de *L. braziliensis*) e o teste ELISA *in house* de antígeno bruto solúvel de *L. braziliensis* desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (PEDRAS, 2002), com viabilidade de produção a curto prazo, que puderam ser incluídos nesta análise.

Para todos os testes sorológicos, avaliou-se inicialmente o desempenho considerando como critério de positividade aquele definido pelo fabricante em bula ou pelo desenvolvedor. Adicionalmente, o desempenho dos testes foi também avaliado considerando o critério de positividade definido por curva ROC (*Receiver operator curve*) a partir dos resultados obtidos para a população de casos e não casos aqui reunidos.

O painel de soros usado na avaliação dos testes de imunoensaio incluiu como “casos” soros de 102 pacientes com comprometimento mucoso e confirmação do diagnóstico de leishmaniose, seja pelo critério parasitológico (100 casos) ou clínico-epidemiológico-prova terapêutica (2 casos). O grupo de 93 “não-casos” foi constituído por soros de 24 pacientes com doença em mucosa e confirmação diagnóstica para outra condição, além de 58 amostras de soro com marcadores para condições infecciosas (hepatites, dengue, zika vírus, sífilis) e 11 amostras de soro de pacientes assintomáticos moradores de Belo Horizonte. Relação das condições infecciosas presentes no painel de soros controles é apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1. Painel de soros com anticorpos para doenças infecciosas utilizado para compor a população de não-casos em estudo de acurácia, Belo Horizonte, 2017-2020**

Condições infecciosas (marcadores)	Número de amostras
Hepatite B	10
Hepatite C	10
Sífilis	10
Dengue IgG/IgM	10
Zika	09
Dengue NS1	09
Moradores assintomáticos de área endêmica para LV	11
Total	69

Detalhes de cada teste sorológico avaliado, sua metodologia de execução e critérios para interpretação do resultado são apresentados a seguir. A amostra de casos e não-casos usada na avaliação de desempenho diagnóstico variou entre os testes, em função de diferenças na disponibilidade dos espécimes utilizados em cada teste (soro, fragmento de tecido fixado em formol, DNA extraído de fragmento mucoso).

#### **4.11.1.1 Imunoensaio ELISA VIRCELL® (*Leishmania* ELISA IgG+IgM)**

O kit é composto por uma microplaca de 96 orifícios sensibilizados com antígeno de *L. infantum*, diluente de amostra, soro “limite”, controles positivo e negativo, conjugado anti-IgG+IgM humano-peroxidase, solução cromógena (Tetrametilbenzidina + Peróxido de Hidrogênio), reagente bloqueador (ácido sulfúrico 0,5M) e tampão fosfato contendo Tween 20 (concentrado 20 vezes). O teste foi executado seguindo estritamente orientação contida em bula. Antes de iniciar, o tampão fosfato contendo Tween 20 foi diluído 1:20 com água tipo I. Em seguida, foram depositados 100µL/poço do diluente de amostra, em cada orifício da microplaca, e adicionados 5µL das amostras de soro, controle positivo, controle negativo e soro “limite” (em duplicata). A microplaca foi tampada com folha adesiva, agitada por 2

min e incubada por 45 min, em câmara úmida a 37°C. Os orifícios da microplaca foram lavados cinco vezes com 300µL de solução de lavagem, usando lavadora de microplacas (Asys Atlantis, Cambridge, GRB) e foram adicionados 100µL/poço do conjugado anti-IgG+IgM humano-peroxidase, incubando-se por 30 min, em câmara úmida a 37°C. Seguida de novas lavagens, foram adicionados 100µL/poço de solução cromógena, incubando-se a microplaca por 20 min, em temperatura ambiente, protegida da luz. A reação enzimática foi interrompida com a adição de 50µL/poço de reagente bloqueador em todos os orifícios da microplaca. Imediatamente após esta etapa, a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 450/620nm, usando um leitor de microplacas (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Device, San Jose, CA, USA). O ensaio foi considerado válido quando a leitura de absorbância dos controles positivo e negativo e do soro “limite” se apresentaram dentro dos intervalos pré-determinados pelo fabricante: positivo maior que 0,9; negativo, inferior que 0,5; e soro “limite” entre 0,55 e 1,5.

O índice de anticorpo foi calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Índice de anticorpos} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{média da absorbância do controle limite}} \times 10$$

De acordo com critérios do fabricante, amostras que apresentaram índices de anticorpos menores que 9 são consideradas negativas, entre 9-11 são consideradas como resultados duvidosos e acima de 11, positivas.

#### **4.11.1.2 Imunoensaio ELISA SERION (*Leishmania* ELISA IgG)**

O kit é composto por uma microplaca de 96 orifícios sensibilizados com antígeno de *Leishmania sp*, tampão de diluição, soro padrão, soro negativo, conjugado anti- IgA, IgG ou IgM humano-fosfatase alcalina, substrato (para-nitrofenilfosfato + azida de sódio a < 0,1%), solução de parada (hidróxido de sódio <0,1 N + EDTA 40mM), solução de lavagem contendo Tween 20 (concentrado 30 vezes) e certificado de controle de qualidade lote-específico. O teste foi executado seguindo estritamente orientação contida em bula. Antes de iniciar, o tampão fosfato contendo Tween 20 foi diluído 1:30 com água tipo I. Em seguida, foram depositados 100µL/poço das amostras de soros testadas (diluído 1:1000 em tampão diluição) e 100µL do soro padrão (em duplicata) controle negativo. Um poço não recebeu amostra, “branco”, para controle dos reagentes. A microplaca foi tampada com folha adesiva, e incubada por 60 min, em câmara úmida a 37°C. Os orifícios da microplaca

foram lavados cinco vezes com 300µL de solução de lavagem, usando lavadora de microplacas (Asys Atlantis, Cambridge, GRB) e foram adicionados 100µL/poço do conjugado anti-IgG+IgM humano-fosfatase alcalina, incubando-se por 30 min, em câmara úmida a 37°C. Seguida de novas lavagens, foram adicionados 100µL/orifício do substrato, incubando-se a microplaca por 30 min, em câmara úmida a 37°C. A reação foi interrompida com a adição de 100µL/poço da solução de parada em todos os orifícios da microplaca. Imediatamente após esta etapa, a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 405/620nm, usando um leitor de microplacas (FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader, Molecular Device, San Jose, CA, USA). O “branco” do substrato foi subtraído de todas as amostras antes da avaliação.

O ensaio foi considerado válido quando valores de densidade ótica (DO) do “branco”, controle negativo e média de densidade ótica (DO) padrão estavam de acordo com o informados na bula. De acordo com a DO do soro padrão obtida em cada placa, o certificado de qualidade informa qual o valor de *Cut-off* de cada placa com o respectivo intervalo para resultados *borderline*.

#### **4.11.1.3 Imunoensaio utilizando proteínas β-TUBULINA e LiHyV**

Imunoensaio utilizando os antígenos proteicos recombinantes β-TUBULINA (de *L. braziliensis*) e LiHyV (de *L. infantum*), padronizado por DUARTE e colaboradores (2015), grupo de pesquisadores do Colégio Técnico da Universidade Federal de Minas Gerais (COLTEC), sob liderança do pesquisador Eduardo Antonio Ferraz Coelho. Para a execução dos testes, placas de ELISA (modelo Jet Biofil FEP-100-096) foram sensibilizadas com 100 µL/poço, utilizando as proteínas β-TUBULINA e LiHyV (concentração de 0,250 e 0,500 µg/poço, respectivamente). As proteínas foram diluídas em tampão Coating buffer e incubadas por até 16 horas a 4° C. Após sensibilização (e as demais etapas do processo) as placas foram lavadas três vezes com 300 µL PBST20 1x. O bloqueio foi realizado com 5% de leite em pó Molico em PBS 1x, 200 µL/poço e incubado por uma hora em estufa a 37° C. As placas foram lavadas como na etapa anterior e 100 µL/poço de soro em duplicata, diluído em 0,5% de leite em pó Molico em PBS 1x (diluição de 1:100 para β-TUBULINA e 1:200 para LiHyV) foram dispensados. As placas foram incubadas e lavadas nas mesmas condições. 100µl/poço de conjugado anti-IgG humano ligado à peroxidase (Goat anti-Human IgG (H+L) Antibody, Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, A18811,

Invitrogen) na diluição 1:5.000 em tampão de incubação foram usados. Novamente as placas foram incubadas e lavadas e 100µl/poço do revelador TMB foram colocados por poço e incubadas ao abrigo da luz por 30 min e a 25°C. A reação foi interrompida com 25 µL/poço de ácido sulfúrico 1:20. Imediatamente após esta etapa, a leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492nm, usando um leitor de microplacas (Vmax Kinetic Microplate Reader, Molecular Devices). Os pontos de corte da reação para a definição do resultado positivo para o imunoenensaio com as proteínas foi informado pelo desenvolvedor como absorbância de 1,187 para o ensaio com a proteína β-TUBULINA e 0,806 para a proteína LiHyV determinado através da média aritmética da absorbância de 20 amostras negativas (não vinculadas ao estudo) somados dois desvios-padrão.

#### **4.11.1.4 Imunoensaio utilizando antígeno solúvel de *L. braziliensis***

Imunoensaio utilizando antígeno solúvel de *L. braziliensis* padronizado em estudo prévio do CRL-IRR (JUNQUEIRA-PEDRAS et al. 2003). Para a realização do teste de ELISA foi utilizado o antígeno solúvel, preparado a partir de promastigotas das cepas MHOM/Br/75/M/2903 de *L. braziliensis*, segundo Ho e colaboradores (1983) Promastigotas do quinto dia de cultivo em meio NNN/LIT foram lavadas em PBS estéril, a 2500 rpm a 4°C, por quatro vezes. Essa massa de promastigotas foi submetida a seis ciclos de rompimento mecânico por sonicação por três min cada. A confirmação do rompimento das promastigotas foi realizada através de microscopia ótica. Após esses procedimentos, o material foi centrifugado a 10.000g durante 30 min a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e congelado a -70°C até o momento do uso. A dosagem de proteína foi realizada segundo a técnica de LOWRY e colaboradores (1951). Placas de ELISA de poliestireno com 96 poços e fundo chato (NUNC®) foram sensibilizadas com 25µg de *L. braziliensis*. 100µl de solução de antígeno em tampão carbonato bicarbonato (TCB) (pH = 9,6) foram colocados em cada poço e incubado por 12 horas a 4°C. As placas foram lavadas cinco vezes com 300µL de PBS<sub>T20</sub> (pH = 7,2), usando lavadora de microplacas (Asys Atlantis, Cambridge, GRB). O bloqueio foi realizado com 150µl/poço de solução de albumina bovina (Sigma®) a 2% em PBS<sub>T20</sub> (pH = 7,2) e incubado por uma hora a 37°C. As placas foram lavadas como na etapa anterior e 100µl do soro do paciente diluído 1:1000 em PBS<sub>T20</sub> foram dispensados em cada poço. As placas foram incubadas e lavadas nas mesmas condições. 100µl/poço de conjugado anti – IgG humano ligado à peroxidase (Sigma® A6029) na diluição 1:1000 em PBS<sub>T20</sub> foram usados. Novamente as placas foram incubadas e lavadas e 100µl do revelador

TMB foram colocados por poço e incubadas por 15 min em local escuro. A leitura foi realizada a 650 nm em leitor de ELISA (Leitor de Elisa Multiskan FC/Multiskan Fc Photometer, da Thermo Fisher Scientific. Todas as amostras foram testadas em duplicata. O resultado de cada amostra correspondeu à média aritmética dos resultados da duplicata. O critério de positividade deste teste foi absorvância acima de 0,274 determinado através da média aritmética da absorvância de 20 amostras negativas (não vinculadas ao estudo) somados dois desvios-padrão.

#### **4.11.2 Técnica de imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina**

Para avaliação da acurácia da IHQ foi utilizado painel de amostras parafinizadas de biopsias de mucosa de 44 casos com confirmação de leishmaniose e 10 casos com outro diagnóstico. A técnica foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina e o sistema de detecção BOND Polymer Refine Red Detection (Leica Microsystems, Newcastle, UK), conforme padronização prévia (FREIRE, 2021). Resumidamente, após montagem, as lâminas foram mantidas em estufa a 56°C por 16 horas e em seguida, incubadas em vaporizador por 20 min, com solução *Trilogy*® 100x diluída (*Cell Marque, Rocklin, CA, EUA*). As lâminas foram incubadas com nova solução *Trilogy* por 40 min em TA e em seguida lavadas três vezes com tampão Tris (5mM Tris base; 140mM NaCl; pH 7,6). Os cortes histológicos foram delimitados com caneta hidrofóbica (*PAP pen, Zymed, São Francisco, CA, EUA*) e cada corte foi incubado com 100 µL de solução de bloqueio (5% de leite em pó desnatado em Tampão Fosfato-Salino). Após novas etapas de lavagens, foram adicionados sobre cada corte 100µL do anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina diluído 1:300 em solução diluente (1% BSA e 0,05% de azida sódica em PBS), que foi incubado por 1 hora, em TA. Seguida de novas etapas de lavagem, 100µL do anticorpo pós primário (*Post Primary AP*) foram adicionados em cada corte e as lâminas foram incubadas por 30 min, em TA. As lâminas foram lavadas novamente e 100µL do polímero (*Polymer AP*) foram adicionados em cada corte, incubando-se por 30 min, em TA. Após repetição do procedimento de lavagem, foram adicionados 100 µL do substrato/cromógeno (na seguinte diluição: 1:10 do reagente A, 1:50 do reagente B, 1:50 do reagente C, diluídos no reagente D) e incubados por 3 min, em TA. Logo após as lâminas foram lavadas com tampão Tris e coradas com hematoxilina por 2 min. Finalmente, as lâminas foram lavadas com água corrente por 3 min, imersas cinco vezes em álcool 100%, secas em estufa a 56°C e montadas com lamínula e Entellan® (Merck).

### 4.11.3 Testes moleculares em investigação para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso

Para análise da acurácia das técnicas moleculares, foi utilizado painel de amostras constituídas por DNA extraído a partir de fragmento de mucosa de 69 pacientes com confirmação de leishmaniose e 14 pacientes com doença mucosa e outro diagnóstico firmado.

#### 4.11.3.1 PCR em tempo real usando sistema Syber

A PCR em tempo real utilizando SYBER™ Green foi realizado utilizando os mesmos *primers* usado na PCR quantitativa com alvo kDNA. A solução da reação continha 1x Power SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0,3 µL de cada *primer*, 10 ng de DNA alvo e água destilada ultrapura para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em duplicata, em placa de 96-well no equipamento de PCR em tempo real StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA). O protocolo de ciclagem consistiu em uma etapa a 95 °C por 10 min para ativação da Taq DNA polymerase seguido por 30 cycles de 15 s a 95 °C para amplificação e 1 min a 60 °C. A leitura da fluorescência foi realizada durante a etapa de extensão (60 °C). A análise da curva *melting* foi realizada nas seguintes condições: uma inicial etapa de desnaturação a 95°C por 15 s seguida de 1 min a 60°C e aumento contínuo de 0,1 °C/segundo até 95 °C. A especificidade da reação de RT-PCR SYBR® Green foi testada pela análise da Temperatura de *melting*. As curvas de “*melting*” foram convertidas em picos de *melting*, traçando a derivada da fluorescência pela derivada da temperatura (dF/dT) versus a temperatura (°C). O cálculo da curva foi realizado pelo software do equipamento. O limite de detecção e *baseline* foram automaticamente determinados usando o StepOne™ Software v2.1.

#### 4.11.3.2 PCR em tempo real usando sistema Taqman

O rRNA SSU TaqMan™ RT-PCR consiste nos *primers* LEIS.U1 (5'-AAGTGCTTTCCCATCGCAACT-3') e LEIS.L1 (5'-ACGCACTAAACCCCTCCAA - 3'), desenhados para amplificar um fragmento de 67-bp e uma sonda fluorogênica LEIS.P1 (FAM 5'- CGGTTCGGTGTGTGGCGCC -3' TAMRA) (Wortmann *et al.*, 2001). A reação RT-PCR foi realizada com volume final de 20 µL, incluindo 10 ng de DNAalvo, 10 µL de TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA), 0,3 µM de cada *primer* e 0,25 µM da sonda. A padronização da PCR foi 50 °C por 2 min (UNG activation),

95 °C por 10 min e 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 60 °C for 1 min. O limite de detecção e *baseline* foram automaticamente determinados usando o StepOne™ Software v2.1.

#### **4.12 Análise dos dados**

O banco de dados deste estudo foi construindo em planilhas do Microsoft Office Excel 2007, exportadas para os programas MedCalc Statistical Software versão 18.2.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, BEL) e SPSS versão 24 para análise.

As fichas de atendimento padronizadas do CRL-IRR constituíram a fonte de informações clínicas neste estudo. Implementados como rotina do serviço, formulários padronizados para registro de todas as avaliações médicas, seja o atendimento de primeira consulta (ANEXO VII), visitas de retorno (ANEXO VIII), ficha de resumo do caso (ANEXO IX) e demais resultados de exames complementares e tratamentos realizados, compõem o prontuário médico dos pacientes, o que permite a reunião de informações de forma padronizada. As fichas foram elaboradas para contemplar a coleta sistematizada de informações demográficas (sexo, idade, escolaridade, local de residência), clínicas (localização, extensão e caracterização das lesões de pele e mucosa, descrição da avaliação otorrinolaringológica, tempo de evolução da doença, presença de comorbidades, uso de medicamentos), laboratoriais (resultados dos exames diagnósticos e de monitorização da toxicidade ao tratamento), além de detalhes da abordagem terapêutica e dados da evolução clínica (ocorrência de eventos adversos durante o tratamento, ocorrência de cura e recidiva avaliados em momentos previamente definidos). Todas estas informações, consideradas variáveis explicativas neste estudo e suas definições operacionais de acordo com protocolo do CRL-IRR estão detalhadas no Quadro 2.

A análise descritiva de todos os resultados, sejam características dos subgrupos de pacientes ou resultados dos testes diagnósticos, foi realizada pelas frequências simples das variáveis categóricas, além de médias e medianas, e seus respectivos desvios padrão (DP) e intervalo interquartil 25-75% (IQ25-75%) para as variáveis contínuas, dependendo do padrão de sua distribuição. Análises comparativas entre os diferentes subgrupos foram exploradas por testes de hipóteses paramétricos e não paramétricos. A análise de variáveis contínuas de distribuição normal foi feita através de comparação de médias utilizando o teste “t” de *student* para a comparação de dois grupos e análise de variância (ANOVA),

para mais de dois grupos. A análise de variáveis contínuas de distribuição não normal foi realizada pela comparação de medianas através do teste U de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis, para três ou mais grupos. Análises envolvendo tabelas de contingência para variáveis categóricas foram executadas pelo teste chi-quadrado, exceto para os casos em que 5 ou menos unidades eram esperados em uma ou mais células, quando se aplicou o teste de Fisher. Para todas as comparações, o nível de significância considerado foi de 5%.

Na compilação dos dados clínicos da coorte, definiu-se D1 como o primeiro dia do tratamento para a leishmaniose após a admissão na coorte. Sobre a avaliação de resposta ao tratamento, apenas os casos que completaram o primeiro tratamento foram considerados na avaliação de resposta nos momentos D90 e D180. Para análise de recidiva (D360), foram avaliados apenas os pacientes considerados curados na avaliação de D180. Ainda que a avaliação de D90 não estivesse registrada oportunamente em prontuário, por não comparecimento do paciente dentro da janela de tolerância de  $\pm 4$  semanas estabelecida neste estudo, as avaliações em D180 e D360 podiam ser consideradas, se disponíveis em prontuário. Mesma situação era válida para o não comparecimento a uma das outras avaliações programadas, que não implicava em prejuízo na contabilização das outras avaliações.

Em relação à avaliação do desempenho dos testes diagnósticos, foram calculadas as medidas sensibilidade, especificidade e acurácia, e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%). Para os testes de detecção de anticorpos em plataforma de imunoenensaio, além do critério de positividade definido pelo fabricante, gráfico da sensibilidade *versus* taxa de falsos positivos, ou *receiver operating curve* (curva ROC), foi construído para estimar o valor de absorbância capaz de gerar o melhor desempenho possível para cada teste nesta amostra.

## 5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados na seguinte ordem:

- a. Caracterização da população estudada – análise descritiva comum às duas etapas deste estudo
- b. Apresentações clínicas da leishmaniose com comprometimento mucoso (Parte I)
- c. Acurácia dos testes para diagnóstico da leishmaniose com comprometimento mucoso (Parte II)

### 5.1 Características gerais da população estudada

Entre abril de 2017 e setembro de 2020, 140 pacientes com suspeita de leishmaniose com acometimento mucoso atendidos no ambulatório do CRL-IRR aceitaram participar da coorte “Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira”. Deste total, 14 participantes da coorte foram excluídos da presente análise, considerando os critérios de legibilidade definidos (5.4.1). As razões para exclusão são discriminadas na Tabela 2.

**Tabela 2. Causas para não inclusão no estudo, Belo Horizonte, 2017-2020**

Motivo	Número de casos
Etiologia do comprometimento mucoso permaneceu indefinida	05
Lesão mucosa não confirmada ao exame físico	05
Óbito antes da conclusão do diagnóstico	01
Recusa em realizar avaliação otorrinolaringológica	01
Perda de seguimento (ausência de informações de tratamento e/ou controle de cura)	02
	Total 14

No total, foram incluídos neste estudo 126 pacientes, 102 com confirmação de leishmaniose e 24 pacientes em que o diagnóstico foi excluído. Nesta amostra havia predomínio de homens (90/126, 71,4%), com mediana de idade de 59 anos, variando de 1 a 88 anos. A mediana do tempo de doença (intervalo entre o início dos sintomas e a entrada na coorte) foi de 12 meses, variando de 1 a 360 meses. Cinquenta e dois pacientes (51,0%)

apresentavam alguma lesão de pele concomitantemente à lesão mucosa. Com exceção de um paciente proveniente do estado da Bahia, todos os outros eram residentes em Minas Gerais, 57 deles em Belo Horizonte e região metropolitana e 68 no interior do Estado. As outras condições clínicas diferentes de leishmaniose diagnosticadas em 24 pacientes incluídos na coorte são apresentadas na Tabela 3.

**Tabela 3. Diagnósticos confirmados nos 24 pacientes com comprometimento mucoso e sem confirmação de leishmaniose, Belo Horizonte, 2017-2020**

<b>Diagnóstico</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Doenças infecciosas</b>	<b>10/24 (41,71)</b>
paracoccidiodomicose	4 (16,6)
histoplasmose	1 (4,2)
Infecção bacteriana	2 (8,3)
cryptococose	1 (4,2)
esporotricose	1 (4,2)
hanseníase	1 (4,2)
<b>Doenças inflamatórias</b>	<b>7/24 (29,2)</b>
rinite alérgica/polipose nasal	7 (29,2)
<b>Doenças neoplásicas</b>	<b>2/24 (8,3)</b>
linfoma Natural Killer	1 (4,2)
carcinoma espinocelular	1 (4,2)
<b>Outras</b>	<b>5/24 (20,8)</b>
comedão	1 (4,2)
liquen plano	1 (4,2)
perfuração septal sequelar (trauma)	3 (12,5)
<b>Total</b>	<b>24 (100)</b>

## 5.2 Investigação etiológica do comprometimento mucoso

Dos 102 pacientes com o diagnóstico firmado de leishmaniose, 100 tinham confirmação parasitológica da infecção por *Leishmania* spp., sendo que em 75 deles (75%) o espécime biológico examinado era fragmento de mucosa e, nos outros 25 casos (25%), a confirmação da infecção foi obtida a partir da lesão de pele concomitante à lesão mucosa, pela maior facilidade de realização do procedimento de biópsia. Dois pacientes foram diagnosticados com base no critério clínico-epidemiológico e prova terapêutica, um deles uma criança com dois anos e lesão cutânea e mucosa contígua na face, com dois outros familiares no domicílio com confirmação parasitológica de leishmaniose. O outro paciente era adulto, com exame histológico sugestivo de doença granulomatosa em que o tratamento foi iniciado em outro serviço antes da investigação completa no CRL-IRR. Estes dois casos foram tratados com AM e evoluíram com cicatrização da lesão, caracterizando a prova terapêutica positiva.

Dos exames diagnósticos realizados em fragmento de mucosa, a PCR foi o principal método para a confirmação da leishmaniose, positiva em 73 dos 79 (92,4%) pacientes em que foi realizada. Quatro (4,9%) pacientes tiveram o diagnóstico de leishmaniose confirmado pela visualização de estruturas amastigotas no tecido (em exame histológico). Como informado em metodologia, pacientes com lesões de pele ativas, simultaneamente à lesão em mucosa, tinham investigação diagnóstica iniciada pela biópsia da lesão de pele. Para 23 casos nesta situação, o exame direto da lesão cutânea (*imprint* ou cultivo) confirmou *Leishmania* spp. em 18 (64,3%), já a PCR para *Leishmania* spp., foi positiva em 5 de 5 (100,0%) pacientes que tiveram fragmento de pele submetido a essa técnica (Tabela. 4).

**Tabela 4. Positividade dos testes diagnósticos entre os casos com comprometimento mucoso por leishmaniose, Belo Horizonte, 2017-2020**

Teste diagnóstico	Exames positivos/exames realizados (%)
Positividade dos exames realizados em fragmento de mucosa	
cPCR- <i>Leishmania</i>	73/79 (92,4)
Presença de amastigota em exame histológico	4/56 (7,1)
Positividade dos exames realizados em fragmento de pele	
Exame direto/cultura	18/28 (64,3)
cPCR- <i>Leishmania</i>	5/5 (100,0)

cPCR: reação em cadeia da polimerase convencional com alvo kDNA

A identificação da espécie de *Leishmania* pela técnica PCR RFLP pôde ser realizada em 56 (54,9%) amostras (pele e mucosa). Em onze (19,6%) pacientes, o resultado foi inconclusivo, *L. braziliensis* foi responsável pela infecção em 44/45 (97,8%) pacientes e *L. guyanensis* em apenas um (1,8%). O paciente infectado por *L. guyanensis*, apesar de residente em Belo Horizonte, relatou ter residido por longo período na região amazônica no passado.

### 5.3 Tratamento realizado em pacientes com comprometimento mucoso por leishmaniose

Em relação ao tratamento, 79 (77,4%) receberam AM (29 pacientes) ou alguma formulação de anfotericina B (50 pacientes), as duas opções terapêuticas preconizados pelo MS. Um paciente foi tratado com pentamidina (infectado por *L. guyanensis*), seis pacientes receberam miltefosina no âmbito de um ensaio clínico e um caso foi tratado com combinação de dois tratamentos. Oito pacientes receberam fluconazol por tempo prolongado como estratégia para redução de sintomas, em todos os casos por contraindicação absoluta às alternativas terapêuticas disponíveis. Sete pacientes não receberam nenhuma intervenção terapêutica, seja por não terem retornado após o

diagnóstico ou por decisão conjunta entre equipe médica e paciente, quando o risco envolvido no tratamento era considerado proibitivo ou desproporcional à manifestação clínica apresentada pelo paciente. Cinco (4,9%) tiveram seu tratamento inicial suspenso precocemente por intolerância intratável ou evento adverso grave. Nestes casos, outra abordagem terapêutica foi introduzida. Para fim de análise, esses casos não tiveram seus dados de cura em D90, D180 e D360 computados, pois a evolução não poderia ser atribuída exclusivamente a um tratamento. Dois pacientes ainda não dispunham de dados do seguimento em D360 por ocasião de encerramento desta análise, não sendo avaliados nessa data.

## **Parte I**

### **5.4 Avaliação das diferentes apresentações clínicas de leishmaniose tegumentar com comprometimento mucoso e seus aspectos demográficos, diagnósticos e prognósticos**

#### **5.4.1 Comparação entre pacientes com confirmação ou não de leishmaniose**

As principais características clínicas dos pacientes incluídos nesta análise são apresentadas na Tabela 5. Analisando encontro de diferença estatisticamente significativa entre os grupos, é possível afirmar que pacientes com comprometimento mucoso por leishmaniose são mais velhos, tem menor grau de escolaridade e maior probabilidade de se apresentarem com lesões de pele simultaneamente ativas em relação aos pacientes com lesões mucosas por outras etiologias. Um paciente incluído no grupo “sem confirmação de leishmaniose” aparece como RECIDIVA porque foi um paciente que já teve leishmaniose com acometimento mucoso no passado e apareceu lesão em pálpebra. Essa lesão foi confirmada CA ocular.

**Tabela 5. Características demográficas e clínicas de grupos de pacientes estratificados de acordo com confirmação ou não do diagnóstico de leishmaniose, Belo Horizonte, 2017-2020**

Variáveis	Com confirmação leishmaniose n=102	Sem confirmação de leishmaniose n=24	Valor de p
Mediana de idade, anos (IQ25-75%)	61,5 (51-74,3)	54,5 (43,3-63)	<b>0,024</b>
Grupo etário			
< 18 anos (%)	4/102 (3,9)	3/24 (12,5)	0,100
18-59 anos (%)	44/102 (43,1)	13/24 (54,2)	
>60 anos (%)	54/102 (52,9)	8/24 (33,3)	
Sexo masculino (%)	76/102 (74,5)	14/24 (58,3)	0,135
Mediana do tempo de sintomas, meses (IQ25-75%)	12 (6-30)	9 (6-24)	0,987
Escolaridade *			
Não alfabetizado (%)	20/100 (20,0)	3/23 (13,0)	<b>0,013</b>
Até ensino fundamental (%)	59/100 (59,0)	9/23 (39,1)	
Até ensino médio (%)	11/100 (11,0)	4/23 (17,4)	
Ensino superior ou mais (%)	5/100 (5,0)	6/23 (26,1)	
Procedência			
BH/região metropolitana (%)	44/102 (43,1)	13/24 (45,8)	

Interior MG (%)	57/102 (55,9)	11/24 (54,2)	0,571
Outro estado (%)	1/102 (1,0)	0/24 (0,0)	
Hipertensão (%)	49/100 (49,0)	7/23 (30,4)	0,163
Infecção pelo HIV (%)	3/99 (3,0)	0/24 (0,0)	1,000
Diabetes mellitus (%)	19/101 (18,9)	1/23 (4,3)	0,119
Uso de corticoide (%)	2/100 (2,0)	0/23 (0,0)	1,000
Doença renal (%)	1/101 (1,0)	0/24 (0,0)	1,000
Doença cardíaca (%)	14/101 (14,0%)	1/24 (4,1)	0,300
Doença pulmonar (%)	7/100 (7,0)	1/24 (4,1)	1
Doença reumatológica (%)	4/101 (4,0)	0/24 (0,0)	1
Consumo regular de álcool (%) **	33/97 (34,0)	7/20 (35,0)	1
Tabagismo (%) **	17/97 (17,5)	5/20 (25,0)	0,766
Recidiva leishmaniose acometimento mucoso (%)	12/102 (11,8)	1/24 (4,1)	0,460
História prévia LC (%)	27/102 (26,5)	2/24 (8,3)	0,064
Presença de lesão em pele	52/102 (51,0)	3/24 (12,5)	0,001
Número de lesões de pele *** (mediana)	1 (1,0-2,0)	2 (1,0- ?))	0,002
Lesão de pele antecede lesão mucosa (%)	4/102 (3,9)	1/24 (4,2)	1
Doença restrita ao nariz (pele ou mucosa) (%)	59/102 (57,8)	16/24 (66,7)	0,493

Localização do acometimento mucoso			
Nasal (%)	91/102 (89,2)	18/24 (75,0)	0,930
Cavidade oral (%)	32/102 (31,4)	7/24 (29,2)	1
Glote/hipofaringe (%)	3/102 (2,9)	0/24 (0,0)	1
Mucosa extra trato respiratório ou digestivo (%)	2/102 (2,0)	1/24 (4,1)	0,472
Mucosa nasal exclusiva (%)	69/102 (67,6)	17/24 (70,8)	0,813

\*excluídos menores de 7 anos \*\* excluídos menores de 18 anos \*\*\* apenas casos com lesão de pele

#### 5.4.2 Principais características clínicas dos casos com confirmação de leishmaniose

As principais características da doença, tratamento e avaliação de cura dos 102 pacientes com diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso são apresentadas na Tabela 6.

Além do comprometimento mucoso, a maioria (52 pacientes, 51%) dos pacientes apresentava lesão de pele ativa, do tipo ulcerada em 58% dos casos. Dentre os 102 casos de leishmaniose, 59 (60,8%) tinham doença restrita ao nariz, com acometimento da mucosa nasal com ou sem acometimento de pele adjacente. Outra observação é a tendência do acometimento de pele, quando presente, ser contíguo à mucosa afetada, o que foi observado em 78,8% dos 52 casos com lesão de pele e mucosa simultâneas. Dos 102 pacientes com leishmaniose confirmada 95 receberam tratamento específico para leishmaniose. Para os 91 pacientes que realizaram tratamento completo e usando a abordagem mais conservadora por intenção de tratar, a taxa de casos considerados curados foi de 19,8% e 57,1% nas avaliações de D90 e D180, respectivamente. Na avaliação de D360, apenas 50,5% dos casos tiveram a inatividade da doença confirmada. Importante ressaltar que ao utilizar esse critério para a estimativa de cura, todos os pacientes que necessitaram de um segundo tratamento por intolerância ou falha ao primeiro esquema e aqueles sem registro em prontuário da avaliação de cura em dado momento (seja D90, D180 ou D360) foram incluídos entre os tratados (denominador), o que tende a subestimar o percentual de cura.

**Tabela 6. Apresentações clínicas, detalhes do tratamento e dados evolutivos dos pacientes com diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020**

Variáveis	Número de casos/total casos (%) ou mediana (IQR25-75%)
Presença de lesões de pele	52/102 (51,0)
Lesão de pele antecedeu lesão mucosa	3/52 (5,8)
Presença de lesão de pele contígua a mucosa	41/52 (78,8)
Lesão de pele em superfície externa do nariz	37/52 (71,1)
Doença restrita ao nariz (mucosa nasal com ou sem acometimento de pele contíguo)	59/102 (57,8)
Número de lesões de pele *** (mediana)	1 (1,0-2,0)
Lesão de pele ulcerada (%)	27/52 (51,9)
Classificação Llanos-Cuentas	
Leve	64/102 (62,7)
Moderada	35/102 (34,3)
Grave	3/102 (2,9)
Caso classificado como recidiva	12/102 (11,8)
História prévia de LC	27/102 (26,5)
Tratamento para LM	88/95 (92,6)
Antimoniato de meglumina	29/102 (28,4)
Anfotericina B lipossomal	49/102 (48,0)
Anfotericina B desoxicolato	1/102 (1,0)

Outro (%) **	16/102 (14,7)
Nenhum tratamento	7/102 (6,9)
Tratamento completo	91/95 (95,8)
Evolução clínica em D90 <sup>1</sup>	
Cura (melhora completa)	18/91 (19,8)
Melhora parcial	60/91 (65,9)
Falha (inalterado/pior)	9/91 (9,9)
Perda seguimento	4/91 (4,4)
Evolução clínica em D180 <sup>1</sup>	
Cura (melhora completa) (%)	52/91 (57,1)
Falha (pior) (%)	23/91 (25,3)
Perda seguimento (%)	7/91 (7,7)
Avaliação em D360 <sup>1</sup>	
Doença inativa (%)	46/91 (50,5)
Doença ativa (%)	7/91 (7,7)
Perda seguimento (%)	8/91 (8,7)

\* excluídos três pacientes com forma disseminada e lesões incontáveis \*\* fluconazol, miltefosina, pentamidina, combinação de tratamento <sup>1</sup> entre os que tiveram tratamento completo \*\*\* apenas casos com lesão de pele

Apresentações clínicas de leishmaniose com comprometimento mucoso:

Com base na presença, localização e número de lesões cutâneas, os pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso puderam ser reunidos em cinco subgrupos com apresentações clínicas distintas. Assim, a partir de um critério estritamente visual, os pacientes foram divididos em:

1. Comprometimento mucoso isolado
2. Comprometimento mucoso e cutâneo concomitantes

- a. Forma cutânea localizada (até seis lesões de pele) e forma disseminada (mais de seis lesões de pele)
- b. Contígua: presença de lesão cutânea contígua à mucosa e não contígua: nenhuma lesão cutânea é contígua à mucosa

Com base nesta classificação, 50 (49%) pacientes apresentavam acometimento mucoso exclusivo enquanto outros 52 (51%) apresentavam lesões em mucosa e pele concomitantes. Dentre os casos com comprometimento de pele associado, em 41 (78,8%) a lesão cutânea era contígua à superfície mucosa. O número de lesões de pele variou de 1 a 11 (excluídos três casos com lesões incontáveis), sendo que 28 (53,8%) dos 52 pacientes apresentavam lesão única de pele e oito (15,4%) pacientes tinham mais de seis lesões (Tabela. 7).

**Tabela 7. Apresentações clínicas observadas entre os pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020.**

Apresentação clínica	Número de pacientes (%)
Acometimento mucoso exclusivo	50/102 (49,0)
Acometimento mucoso e cutâneo concomitantes	52/102 (51,0)
lesão de pele localizada	44/52 (84,6)
lesão de pele contígua	41/52 (78,8)
lesão de pele não contígua	11/52 (21,2)
LC disseminada	8/52 (15,4)

Pacientes com as várias apresentações clínicas da leishmaniose com comprometimento mucoso foram comparadas a fim de se investigar eventual existência de diferenças frente aos testes diagnósticos ou na resposta aos tratamentos e desfechos clínicos (prognóstico). As principais observações a partir das comparações realizadas são apresentadas a seguir.

### 5.4.3 Comparação entre pacientes com lesão mucosa exclusiva e pacientes com lesão mucosa e cutânea simultâneas

Na comparação entre pacientes com ou sem presença de lesão cutânea concomitante ao comprometimento mucoso, foram observadas as seguintes diferenças estatisticamente significantes: casos com lesão mucosa exclusiva exibiam maior tempo de doença, maior proporção de casos com comprometimento restrito ao nariz e de formas mais graves na classificação de LLANOS-CUENTAS e colaboradores (1997). Por outro lado, casos com comprometimento cutâneo e mucoso tinham maior taxa de lesão em cavidade oral e de positividade no estudo imuno-histoquímico (Tabela.8).

**Tabela 8. Características demográficas, clínicas, laboratoriais e evolutivas de pacientes com leishmaniose estratificados segundo a presença ou não de lesão cutânea concomitante, Belo Horizonte, 2017-2020**

Variáveis	Acometimento mucoso exclusivo n=50	Acometimento mucoso e cutâneo simultâneo n= 52	Valor p
Mediana de idade, anos (IQ25-75%)	63 (53-76)	59,5 (48,8-73)	0,461
Grupo etário			
< 18 anos (%)	1/50 (2,0)	3/52 (5,8)	0,569
18-59 anos (%)	21/50 (42,0)	23/52 (44,2)	
>60 anos (%)	28/50 (56,0)	26/52 (50,0)	
Sexo masculino (%)	37/50 (74,0)	39/52 (75,0)	1
Mediana do tempo de sintomas, meses (IQ25-75%)	12 (7,7-49,7)	8 (4-18)	<b>0,004</b>
Escolaridade *			
Não alfabetizado (%)	12/50 (24,0)	8/52 (15,4)	

Até ensino fundamental (%)	26/50 (52,0)	33/52 (63,5)	0,445
Até ensino médio (%)	5/50 (10,0)	6/52 (11,5)	
Ensino superior ou mais (%)	4/50 (8,0)	1/52 (2,0)	
Procedência			
BH/região metropolitana (%)	22/50 (44,0)	22/52 (42,3)	
Interior MG (%)	28/50 (56,0)	29/52 (55,8)	0,613
Outro estado (%)	0/50 (0,0)	1/52 (1,9)	
Hipertensão (%)	24/48 (50,0)	25/52 (48,1)	1
Infecção pelo HIV (%)	1/47 (2,1)	2/52 (3,8)	1
Diabetes mellitus (%)	7/49 (14,3)	12/52 (23,1)	0,314
Uso de corticoide (%)	0/48 (0,0)	2/52 (3,8)	0,496
Doença renal, hepática, cardíaca ou pulmonar (%)	9/49 (18,4)	5/52 (9,6)	0,255
Doença reumatológica (%)	2/49 (4,1)	2/52 (3,8)	1
Consumo regular de álcool (%) **	15/48 (31,2)	18/49 (36,7)	0,619
Tabagismo (%) **	7/49 (14,3)	10/48 (20,8)	0,594
Recidiva leishmaniose acometimento mucoso (%)	7/50 (14,0)	5/52 (9,6)	0,551
História prévia LC (%)	15/50 (30,0)	12/52 (23,1)	0,428
Localização acometimento mucoso			
Nasal (%)	46/50 (92,0)	46/52 (88,5)	0,741
Cavidade oral (%)	10/50 (20,0)	23/52 (44,2)	0,011

Glote/hipofaringe (%)	3/50 (6,0)	0/52 (0,0)	0,114
Mucosa extra trato respiratório/ digestivo (%)	0/50 (0,0)	2/52 (3,8)	0,495
Mucosa nasal exclusiva (%)	39/50 (78,0)	30/52 (60,0)	0,035
Classificação Llanos-Cuentas			
Leve (%)	36/50 (72,0)	28/52 (53,8)	0,012
Moderada (%)	11/50 (22,0)	24/52 (48,1)	
Grave (%)	3/50 (6,0)	0/52 (0,0)	
Exames laboratoriais			
Presença DNA <i>Leishmania</i> spp. (%)	45/46 (97,8)	23/25 (92,0)	0,282
Imuno-histoquímica (%)	12/29 (41,4)	8/15 (53,3)	0,009
ELISA VIRCELL® (%)	42/48 (87,5)	49/51 (96,1)	0,152
ELISA PCPP (%)	36/48 (75,0)	44/51 (86,3)	0,204
Tratamento completo (%)	42/45 (93,3)	49/50 (98,0)	0,342
Tratamento para LM			
Antimoniato de meglumina (%)	13/50 (26,0)	16/52 (30,8)	0,651
Anfotericina B lipossomal (%)	24/50 (48,0)	25/52 (48,1)	
Anfotericina B desoxicolato (%)	1/50 (2,0)	0/52 (0,0)	
Outro (%)	7/50 (14,0)	9/52 (17,3)	
Nenhum (%)	5/50 (10,0)	2/52 (3,8)	

Evolução clínica em D90 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	8/42 (19,0)	10/49 (20,4)	0,189
Melhora parcial (%)	31/42 (73,8)	29/49 (59,2)	
Falha (pior) (%)	3/42 (7,1)	6/49 (12,2)	
Perda seguimento (%)	0/42 (0,0)	4/49 (8,2)	
Evolução clínica em D180 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	27/42 (64,3)	25/49 (51,0)	0,286
Falha (pior) (%)	3/42 (7,1)	8/49 (16,3)	
Falha (inalterado/pior) (%)	7/42 (16,7)	5/49 (10,2)	
Perda seguimento (%)	2/42 (4,7)	5/49 (10,2)	
Avaliação em D360 <sup>2</sup>			
Recidiva (%)	2/27 (7,4)	0/25 (0,0)	0,647

\*excluídos menores de 7 anos    \*\* excluídos menores de 18 anos <sup>1</sup> entre os que tiveram tratamento completo    <sup>2</sup> entre os curados em D180

#### 5.4.4 Comparação entre pacientes com lesão de pele contígua à mucosa e aqueles com lesão de pele não contígua à mucosa

Em que pese o pequeno número de pacientes no subgrupo com lesões de pele não contíguas à mucosa, destacam-se a maior proporção de homens ( $p=0,047$ ), menor tempo de doença (mediana de 3 x 11 meses,  $p=0,002$ ), maior proporção de lesões de pele do tipo ulcerado ( $p=0,005$ ) neste subgrupo em relação a pacientes com lesão de pele exclusivamente contígua à mucosa. A diferença nas variáveis, presença de lesão restrita ao nariz ou acometimento da pele sobre o nariz e forma disseminada estão atreladas diretamente ao critério de estratificação dos grupos nesta análise (Tabela 9).

**Tabela 9. Características demográficas, clínicas e evolutivas de pacientes com acometimento mucoso e cutâneo simultâneo, estratificados de acordo com a localização da lesão cutânea (contígua ou não contígua à mucosa), Belo Horizonte, 2017-2020**

Variáveis	Lesão de pele não contígua à mucosa n=11	Lesão de pele contígua à mucosa n= 41	Valor p
Mediana de idade, anos (IQ25-75%)	56 (45-76)	60 (49,5-73)	0,911
Grupo etário			
< 18 anos (%)	0/11 (0,0)	3/41 (7,3)	0,549
18-59 anos (%)	6/11 (54,5)	17/41 (41,5)	
>60 anos (%)	5/11 (45,4)	21/41 (51,2)	
Sexo masculino (%)	11/11 (100,0)	28/41 (68,3)	0,047
Mediana do tempo de sintomas, meses, (IQ25-75%)	3 (3-5)	11 (6-26,5)	<b>0,002</b>
Escolaridade *			
Não alfabetizado (%)	2/11 (18,2)	6/37 (16,2)	0,300
Até ensino fundamental (%)	6/11 (54,5)	20/37 (54,0)	
Até ensino médio (%)	2/11 (18,2)	7/37 (18,9)	
Ensino superior ou mais (%)	1/11 (9,1)	4/37 (10,8)	
Procedência			
BH/região metropolitana (%)	8/11(72,7)	14/41 (34,1)	0,069
Interior MG (%)	3/11 (27,3)	26/41 (63,4)	

Outro estado (%)	0/11 (0,0)	1/41 (2,4)	
Hipertensão (%)	5/11 (45,4)	20/41 (48,8)	0,845
Infecção pelo HIV (%)	1/11 (9,0)	1/41 (2,4)	0,382
Diabetes mellitus (%)	2/11 (18,1)	10/41 (24,4)	1
Uso de corticoide (%)	1/11 (9,0)	1/41 (2,4)	0,382
Doença renal, hepática, cardíaca ou pulmonar (%)	3/11 (27,3)	2/41 (4,9)	0,057
Doença reumatológica (%)	1/11 (9,0)	1/41 (2,4)	0,382
Consumo regular de álcool (%) **	6/11 (54,5)	12/38 (31,6)	0,286
Tabagismo (%) **	4/11 (36,4)	6/37 (16,2)	0,206
Recidiva leishmaniose acometimento mucoso (%)	2/11 (81,8)	3/41 (92,7)	0,278
História prévia de LC (%)	3/11 (27,3)	9/41 (21,9)	0,701
Número de lesões de pele * (mediana)	4 (1,0-4,0)	1(1,0-2,0)	0,042
Lesão de pele ulcerada (%)	10/11 (90,9)	17/41 (41,5)	0,005
Lesão de pele papular/nodular (%)	7/11 (63,6)	31/41 (75,6)	0,760
Lesão de pele antecede a lesão mucosa (%)	1/11 (9,1)	3/41 (7,3)	0,845
Lesão na superfície externa do nariz (%)	4/11 (36,4)	33/41 (80,5)	0,008
Lesão restrita ao nariz (mucosa nasal com ou sem acometimento de pele contíguo) (%)	1/11 (9,1)	19/41 (46,3)	0,035

LC disseminada (> 6 lesões) (%)	5/11 (45,4)	3/41 (7,3)	0,007
Localização acometimento mucoso			
Nasal (%)	9/11 (81,8)	35/41 (85,4)	1
Cavidade oral (%)	6/11 (54,5)	17/41 (41,5)	0,506
Outra mucosa (%)	2/11 (18,2)	0/41 (0,0)	0,041
Mucosa nasal exclusiva (%)	5/11 (45,4)	25/41 (61,0)	0,495
Classificação Llanos-Cuentas			
Leve (%)	4/11 (36,4)	24/41 (58,5)	0,308
Moderada (%)	7/11 (63,6)	17/41 (41,5)	
Grave (%)	0/11 (0,0)	0/41 (0,0)	
Exames laboratoriais			
Presença DNA <i>Leishmania</i> spp (%)	5/6 (83,3)	18/19 (94,7)	0,430
Imuno- histoquímica (%)	3/4 (75,0)	5/11 (45,4)	0,451
ELISA VIRCELL® (%)	10/11 (90,9)	39/40 (97,5)	0,388
ELISA PCPP (%)	10/11 (90,9)	34/40 (85,0)	1
Tratamento completo (%)	10/10 (100,0)	39/40 (97,5)	1
Tratamento para LM			
Antimoniato de meglumina (%)	4/11 (36,4)	12/41 (29,3)	0,436
Anfotericina B lipossomal (%)	3/11 (27,3)	22/41 (56,7)	

Anfotericina B desoxicolato (%)	0/11 (0,0)	0/41 (0,0)	
Outro (%)	3/11 (27,3)	6/41 (14,6)	
Nenhum (%)	1/11 (9,1)	1/41 (2,4)	
Evolução clínica em D90 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	3/10 (30,0)	7/39 (17,9)	
Melhora parcial (%)	5/10 (5,0)	24/39 (61,5)	0,838
Falha (pior) (%)	1/10 (1,0)	5/39 (12,8)	
Perda seguimento	1/10 (1,0)	3/39 (7,7)	
Evolução clínica em D180 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	5/10 (50,0)	20/39 (51,3)	
Melhora parcial (%)	0/10 (0,0)	8/39 (20,5)	0,228
Falha (inalterado/pior) (%)	2/10 (20,0)	3/39 (7,7)	
Perda seguimento (%)	2/10 (20,0)	3/39 (7,7)	
Avaliação de recidiva em D360 <sup>2</sup>			
Recidiva (%)	0/5 (0,0)	0/20 (0,0)	1

\*excluídos menores de 7 anos \*\* excluídos menores de 18 anos <sup>1</sup> entre os que tiveram tratamento completo  
<sup>2</sup> entre os curados em D180 \*\*\* apenas casos com lesão de pele

#### 5.4.5 Comparação entre pacientes com lesão de pele localizada e aqueles com lesão de pele disseminada

Apesar do pequeno número de pacientes com mais de seis lesões cutâneas (aqui tomadas como critério operacional da forma disseminada da leishmaniose), o que diminui o poder para o reconhecimento de diferenças, observou-se diferenças significativas observadas entre pacientes com e sem doença disseminada em relação à mediana de idade ( $p=0,031$ ), tempo de sintomas ( $p=0,013$ ) e grau de instrução formal (0,014), todos eles inferiores no

subgrupo com a forma disseminada. As diferenças nas taxas de cura possivelmente são decorrentes do alto percentual de perdas de seguimento no grupo com a forma disseminada, que inclui apenas oito pacientes e devem ser avaliadas com cautela diante do pequeno número de casos avaliados em D180 com a forma disseminada. (Tabela 10).

**Tabela 10. Características demográficas, clínicas e evolutivas de pacientes com acometimento mucoso no contexto de leishmaniose cutânea localizada ou disseminada, Belo Horizonte, 2017-2020**

Variáveis	Lesão mucosa e cutânea não disseminada n=44	Lesão mucosa e cutânea disseminada n=8	Valor p
Mediana de idade, anos (IQ25-75%)	62 (53-74,5)	44,5 (43-57)	0,024
Grupo etário			
< 18 anos (%)	3/44 (6,8)	0/8 (0,0)	0,027
18-59 anos (%)	16/44 (36,4)	7/8 (87,5)	
>60 anos (%)	25/44 (56,8)	1/8 (12,5)	
Sexo masculino (%)	31/44 (70,4)	8/8 (100,0)	0,177
Mediana do tempo de sintomas, meses (IQ25-75%)	9 (5-24,5)	3 (2-7,7)	0,013
Escolaridade *			
Não alfabetizado (%)	8/42 (19,0)	5/8 (62,5)	0,014
Até ensino fundamental (%)	28/42 (66,7)	1/8 (12,5)	
Até ensino médio (%)	5/42 (11,9)	1/8 (12,5)	

Ensino Superior (%)	0/42 (0,0)	1/8 (12,5)	
Procedência			
BH/região metropolitana (%)	17/44 (38,6)	5/8 (62,5)	0,436
Interior MG (%)	26/44 (59,1)	3/8 (37,5)	
Outro estado (%)	1/44 (2,3)	1/8 (12,5)	
Hipertensão (%)	24/44 (54,5)	1/8 (12,5)	0,051
Infecção pelo HIV (%)	2/44 (4,5)	0/8 (0,0)	1
Diabetes mellitus (%)	10/44 (22,7)	2/8 (25,0)	1
Uso de corticoide (%)	2/44 (4,5)	0/8 (0,0)	1
Doença renal, hepática, cardíaca ou pulmonar (%)	5/44 (11,4)	0/8 (0,0)	1
Doença reumatológica (%)	2/44 (4,5)	0/8 (0,0)	1
Consumo regular de álcool (%) **	14/41 (34,1)	4/8 (50,0)	0,443
Tabagismo (%) **	9/40 (22,5)	1/8 (12,5)	1
Recidiva leishmaniose acometimento mucoso (%)	5/44 (11,4)	0/8 (0,0)	0,316
Lesão de pele antecede a lesão mucosa (%)	4/44 (9,1)	0/8 (0,0)	1
História prévia LC (%)	9/44 (20,4)	3/8 (37,5)	0,366
Lesão de pele ulcerada (%)	20/44 (45,4)	7/8 (87,5)	0,051
Lesão de pele papular/nodular (%)	30/44 (62,2)	8/8 (100,0)	0,090
Lesão na superfície externa do nariz (%)	33/44 (75,0)	4/8 (50,0)	0,207

Lesão de pele contígua à mucosa (%)	38/44 (79,2)	3/8 (37,5)	0,007
Número de lesões de pele*** (mediana)	1 (1,0-2,0)	10 (9,7-10,2)	0,000
Localização do acometimento mucoso			
Nasal (%)	38/44 (86,4)	6/8 (75,0)	0,592
Cavidade oral (%)	17/44 (38,6)	6/8 (75,0)	1
Outra mucosa (%)	1/44 (2,3)	1/8 (12,5)	0,286
Mucosa nasal exclusiva (%)	27/44 (61,4)	3/8 (37,5)	0,260
Classificação Llanos-Cuentas			
Leve (%)	23/44 (52,3)	5/8 (62,5)	0,711
Moderada (%)	21/44 (47,7)	3/8 (37,5)	
Grave (%)	0/44 (0,0)	0/8 (0,0)	
Exames Laboratoriais			
Presença DNA <i>Leishmania</i> spp. (%)	20/22 (90,9)	3/3 (100,0)	1
Imuno-histoquímica (%)	7/13 (53,8)	1/8 (12,5)	0,962
ELISA VIRCELL® (%)	42/44 (95,4)	7/7 (100,00)	1
ELISA PCPP (%)	37/44 (84,1)	7/7 (100,0)	0,573
Tratamento completo (%)	41/42 (97,6)	8/8 (100,0)	1
Tratamento para LM			
Antimoniato de meglumina (%)	10/44 (22,7)	6/8 (75,0)	

Anfotericina B lipossomal (%)	24/44 (54,5)	1/8 (12,5)	0,008
Anfotericina B desoxicolato (%)	0/44 (0,0)	0/8 (0,0)	
Outro (%)	8/44 (18,2)	1/8 (12,5)	
Nenhum (%)	2/44 (4,5)	0/8 (0,0)	
Evolução clínica em D90 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	8/41 (19,5)	2/8 (25,0)	0,826
Melhora parcial (%)	24/41 (58,5)	5/8 (62,5)	
Falha (pior) (%)	5/41 (12,2)	1/8 (12,5)	
Perda seguimento (%)	4/41 (9,7)	0/8 (0,0)	
Evolução clínica em D180 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	22/41 (53,7)	3/8 (37,5)	0,030
Falha (inalterado) (%)	8/41 (19,5)	0/8 (0,0)	
Falha (pior) (%)	4/41 (9,8)	1/8 (12,5)	
Perda seguimento (%)	2/41 (4,9)	3/8 (37,5)	
Avaliação de recidiva em D360 <sup>2</sup>			
Recidiva (%)	3/22 (6,8)	0/3 (0,0)	0,791

\*excluídos menores de 7 anos \*\* excluídos menores de 18 anos <sup>1</sup> entre os que tiveram tratamento completo <sup>2</sup> entre os curados em D180 \*\*\* apenas casos com lesão de pele

#### 5.4.6 Comparação entre pacientes com lesão de pele ou mucosa restrita ao nariz e aqueles com lesão de pele ou mucosa não restrita ao nariz

Além das diferenças esperadas na proporção de achados relacionados às lesões de pele, relacionadas ao próprio critério de estratificação dos pacientes, observou-se maior tempo de evolução da doença entre casos com a forma nasal exclusiva (p=0,05) e maior

positividade ao ELISA comercial VIRCELL® (bula) entre pacientes com doença não restrita ao nariz (Tabela 11).

**Tabela 11. Características demográficas, clínicas e evolutivas de pacientes com LM estratificados de acordo com a localização da lesão: restrita ou não ao nariz, Belo Horizonte, 2017-2020**

Variáveis	Leishmaniose restrita ao nariz (mucosa e/ou pele) n=59	Leishmaniose não restrita ao nariz n=43	Valor p
Mediana de idade, anos (IQ25-75%)	62 (53-75)	59 (51-73)	0,531
Grupo etário			
< 18 anos (%)	1/59 (1,7)	3/43 (7,0)	0,363
18-59 anos (%)	25/59 (42,4)	19/43 (44,2)	
>60 anos (%)	33/59 (55,9)	21/43 (48,8)	
Sexo masculino (%)	41/59 (69,5)	35/43 (81,4)	0,250
Mediana do tempo de sintomas, meses (IQ25-75%)	12 (7-55)	8 (4-18)	<b>0,002</b>
Escolaridade *			
Não alfabetizado (%)	14/58 (24,1)	6/42 (14,3)	0,519
Até ensino fundamental (%)	32/58 (55,2)	27/42 (64,3)	
Até ensino médio (%)	6/58 (10,3)	5/42 (11,9)	
Até ensino superior (%)	4/58 (6,9)	1/42 (2,4)	

Procedência			
BH/região metropolitana (%)	22/59 (37,3)	22/43 (51,2)	0,287
Interior MG (%)	36/59 (61,0)	21/43 (48,8)	
Outro estado (%)	1/59 (1,7)	0/43 (0,0)	
Hipertensão (%)	28/58 (48,3)	21/42 (50,0)	1
Infecção pelo HIV (%)	3/57 (5,3)	0/42 (0,0)	0,260
Uso de corticoide (%)	2/58 (3,4)	0/42 (0,0)	0,508
Diabetes mellitus (%)	11/59 (18,6)	8/42 (19,0)	1
Doença renal, hepática, cardíaca ou pulmonar (%)	11/59 (18,6)	3/42 (7,1)	0,145
Doença reumatológica (%)	4/59 (6,8)	0/42 (0,0)	0,139
Consumo regular de álcool (%) **	17/57 (29,8)	16/39 (41,0)	0,281
Tabagismo (%)**	10/56 (17,9)	7/40 (17,5)	1
Recidiva leishmaniose acometimento mucoso (%)	8/59 (13,5)	4/43 (9,3)	0,554
Lesão de pele antecede a lesão mucosa (%)	1/59 (1,7)	3/43 (6,7)	0,307
História prévia de LC (%)	17/59 (28,8)	10/43 (23,2)	0,651
Presença de lesão de pele (%)	20/59 (33,9)	32/43 (74,4)	0,000
Número de lesões de pele *** (mediana)	2 (1-5,2)	1 (1,0-1,0)	
Lesão de pele contígua à mucosa (%)	19/59 (32,2)	22/43 (51,2)	0,066

Lesão de pele ulcerada (%)	5/59 (8,5)	22/43 (51,1)	0,000
Lesão de pele papular/nodular (%)	14/59 (23,7)	24/43 (55,8)	0,002
Exames Laboratoriais			
Presença DNA <i>Leishmania</i> spp. (%)	45/46 (97,8)	23/25 (92,0)	0,282
Imuno-histoquímica (%)	14/30 (46,7)	6/14 (42,8)	0,179
ELISA VIRCELL® (%)	51/58 (87,9)	40/41 (97,6)	0,135
ELISA PCPP (%)	42/58 (72,4)	38/41 (92,7)	0,018
Tratamento completo (%)	51/54 (94,4)	40/40 (100,0)	0,136
Tratamento para LM			
Antimoniato de meglumina (%)	16/59 (27,1)	13/43 (30,2)	0,779
Anfotericina B lipossomal (%)	29/59 (49,1)	20/43 (46,5)	
Anfotericina B desoxicolato (%)	1/59 (1,7)	0/43 (0,0)	
Outro (%)	9/59 (15,2)	7/43 (16,3)	
Nenhum (%)	4/59 (6,8)	3/43 (7,0)	
Evolução clínica em D90 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	11/51 (21,6)	7/40 (17,5)	0,155
Melhora parcial (%)	33/51 (64,7)	27/40 (67,5)	
Falha (inalterado/pior) (%)	3/51 (5,9)	6/40 (15,0)	
Perda seguimento (%)	4/51 (7,8)	0/40 (0,0)	

Evolução clínica em D180 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	32/51 (62,7)	20/40 (50,0)	0,807
Falha (inalterado) (%)	6/51 (11,8)	5/40 (12,5)	
Falha (pior) (%)	7/51 (13,7)	5/40 (12,5)	
Perda seguimento (%)	3/51 (5,9)	4/40 (10,0)	
Avaliação de recidiva em D360 <sup>2</sup>			
Recidiva (%)	4/32 (12,5)	1/20 (5,0)	0,494

\*excluídos menores de 7 anos \*\* excluídos menores de 18 anos <sup>1</sup> entre os que tiveram tratamento completo  
<sup>2</sup> entre os curados em D180 \*\*\* apenas casos com lesão de pele

#### **5.4.7 Comparação entre pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso de via aero digestiva alta (com ou sem lesão de pele contígua) e cutâneo e pacientes com lesões de pele não contíguas e mucosas atípicas extra via aero digestiva alta**

Na comparação entre pacientes com acometimento mucoso restrito às vias aero digestivas altas, com ou sem lesões de pele contíguas, aqueles com lesões em outras mucosas ou lesões de pele não contíguas revelou diferença prognóstica significativa com menor proporção de melhora ou cura entre casos do primeiro grupo na avaliação de D180. A avaliação da recidiva foi prejudicada pelas perdas no grupo com lesão não contígua (Tabela 12).

**Tabela 12. Comparação entre pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso de via aero digestiva alta (com ou sem lesão de pele contígua) e cutâneo e pacientes com lesões de pele não contíguas e mucosas atípicas extra via aero- digestiva alta, Belo Horizonte, 2017-2020**

Variáveis	Acometimento mucoso de via aero digestiva alta (com ou sem lesão de pele contígua) n=69	Acometimento mucoso em qualquer sítio e cutâneo não contíguo n=25	Valor p
Mediana de idade, anos (IQ25-75%)	63 (53-76)	62 (52-73,5)	0,524
Grupo etário			
< 18 anos (%)	2/69 (2,9)	2/25 (8,0)	0,537
18-59 anos (%)	27/69 (39,1)	10/25 (40,0)	
>60 anos (%)	40/69 (57,8)	13/25 (52,0)	
Sexo masculino (%)	50/69 (72,5)	18/25 (72,0)	1
Mediana do tempo de sintomas, meses (IQ25-75%)	12 (65-47)	9 (5-21,5)	0,104
Escolaridade *			
Não alfabetizado (%)	16/68 (23,5)	4/24 (16,7)	0,669
Até ensino fundamental (%)	38/68 (55,9)	16/24 (66,7)	
Até ensino médio (%)	7/68 (10,3)	3/24 (12,5)	
Até ensino superior (%)	4/68 (5,9)	0/24 (0,0)	

Procedência			
BH/região metropolitana (%)	28/69 (40,6)	11/25 (44,0)	0,808
Interior MG (%)	40/69 (58,0)	14/25 (56,0)	
Outro estado (%)	1/69 (1,4)	0/25 (0,0)	
Hipertensão (%)	32/67 (47,8)	16/25 (64,0)	0,241
Infecção pelo HIV (%)	3/66 (4,5)	0/25 (0,0)	0,559
Diabetes mellitus (%)	11/68 (16,2)	6/25 (24,0)	0,381
Uso de corticoide (%)	2/67 (2,3)	0/25 (0,0)	0,605
Doença renal, hepática, cardíaca ou pulmonar (%)	16/67 (23,9)	3/25 (12,5)	0,259
Doença reumatológica (%)	4/68 (5,9)	0/25 (0,0)	0,571
Consumo regular de álcool (%) **	21/65 (32,3)	8/23 (34,8)	1
Tabagismo (%) **	10/65 (15,4)	6/23 (26,1)	0,345
Recidiva leishmaniose acometimento mucoso (%)	10/69 (14,5)	2/25 (8,0)	0,506
História prévia de LC (%)	20/69 (29,0)	4/25 (16,0)	0,286
Presença de lesão de pele (%)	20/69 (29,0)	24/25 (96,0)	0,000
Número de lesões de pele (mediana) ***	1 (1,0-1,0)	1,5 (1,0-2,0)	0,000
Lesão de pele antecede lesão mucosa (%)	1/69 (1,4)	3/25 (12,0)	0,056
Lesão de pele ulcerada (%)	5/69 (7,2)	15/25 (60,0)	0,000

Lesão de pele papular/nodular (%)	14/69 (20,3)	16/25 (64,0)	0,000
Classificação Llanos-Cuentas			
Leve (%)	50/69 (72,5)	9/25 (36,0)	0,000
Moderada (%)	16/69 (23,2)	16/25 (64,0)	
Grave (%)	3/69 (4,3)	0/25 (0,00)	
Exames laboratoriais			
Presença DNA <i>Leishmania</i> spp. (%)	54/56 (96,4)	11/12 (91,7)	0,447
Imuno-histoquímica (%)	16/36 (44,4)	3/6 (50,0)	0,051
ELISA VIRCELL® (%)	60/67 (89,5)	24/25 (96,0)	0,440
ELISA PCPP (%)	51/67 (76,1)	22/25 (88,0)	0,259
Tratamento completo (%)	60/64 (93,7)	23/23 (100,0)	0,364
Tratamento para LM			
Antimoniato de meglumina (%)	19/69 (27,5)	4/25 (16,0)	0,009
Anfotericina B lipossomal (%)	34/69 (49,3)	14/25 (56,0)	
Anfotericina B desoxicolato (%)	1/69 (1,4)	0/25 (0,0)	
Outro (%)	10/69 (14,5)	5/25 (20,0)	
Nenhum (%)	5/69 (7,2)	2/25 (8,0)	
Evolução clínica em D90 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	12/60 (20,0)	4/23 (17,4)	

Melhora parcial (%)	40/60 (66,7)	15/23 (65,2)	0,642
Falha (inalterado/pior) (%)	4/60 (6,7)	4/23 (17,4)	
Perda seguimento (%)	4/60 (6,7)	0/23 (0,0)	
Evolução clínica em D180 <sup>1</sup>			
Cura (melhora completa) (%)	36/60 (60,0)	13/23 (52,2)	
Melhora parcial (%)	7/60 (11,7)	4/23 (17,4)	0,025
Falha (inalterado/pior) (%)	10/60 (16,7)	1/23 (3,5)	
Perda seguimento (%)	3/60 (5,0)	1/23 (3,5)	
Avaliação de recidiva em D360 <sup>2</sup>			
Recidiva (%)	4/36 (11,1)	1/13 (7,7)	1

\*excluídos menores de 7 anos \*\* excluídos menores de 18 anos <sup>1</sup> entre os que tiveram tratamento completo  
<sup>2</sup> entre os curados em D180 \*\*\* apenas casos com lesão de pele

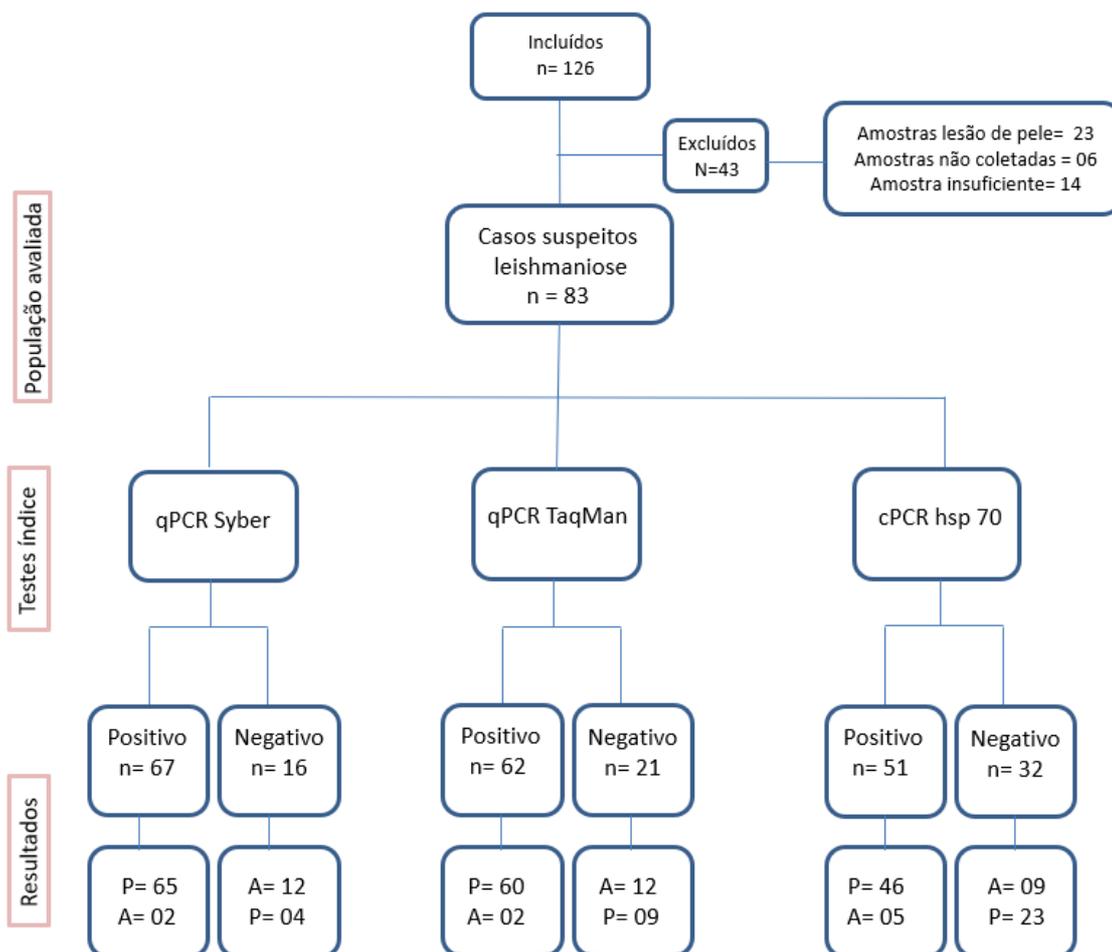
## Parte II

### 5.5 Acurácia dos testes para diagnóstico da leishmaniose com comprometimento mucoso

#### 5.5.1 Testes moleculares

Três protocolos para execução da técnica de PCR, variações da técnica já em uso no CRL-IRR, foram selecionados para avaliação de desempenho, são eles: cPCR com alvo gênico hsp70, qPCR usando sistema de detecção Syber e qPCR usando sistema de detecção TaqMan. Para tanto, material extraído de 83 biópsias de lesão mucosa foi avaliado, sendo 69 procedentes de pacientes com confirmação de leishmaniose e 14 de pacientes com confirmação de outros diagnósticos não leishmaniose, tal como ilustrado na Figura 2.

**Figura 2. Avaliação da positividade de variações da técnica de PCR aplicada aos casos suspeitos de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020**



Legenda: : P: condição presente A: condição ausente

Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados das medidas de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia global dos testes são apresentados na Tabela 13. A maior sensibilidade foi detectada para a técnica qPCR Syber (94,2%), sem diferença para a qPCR TaqMan, ambas com especificidade de 85,7%, que não foi diferente estatisticamente da especificidade da técnica cPCR hsp70.

**Tabela 13. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes moleculares para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020**

Testes moleculares	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
	IC <sub>95</sub> % (n)	IC <sub>95</sub> % (n)	IC <sub>95</sub> % (n)
<i>qPCR Syber</i>	94,2 (85,8-98,4) (69)	85,7 (57,2-98,2) (14)	92,8 (84,9-97,3) (83)
<i>qPCR TaqMan</i>	87,0 (76,7-93,9) (69)	85,7 (57,2-98,2) (14)	86,7 (77,5-93,2) (83)
<i>cPCR hsp70</i>	66,7 (54,3-77,6) (69)	64,3 (35,1-87,2) (14)	66,3 (55,0-76,3) (83)

**Quadro 4** Significância estatística (valores de p) para as comparações de sensibilidade, especificidade e acurácia entre os diferentes protocolos de PCR para *Leishmania spp* (complementa tabel 13). Belo Horizonte, 2017-2020

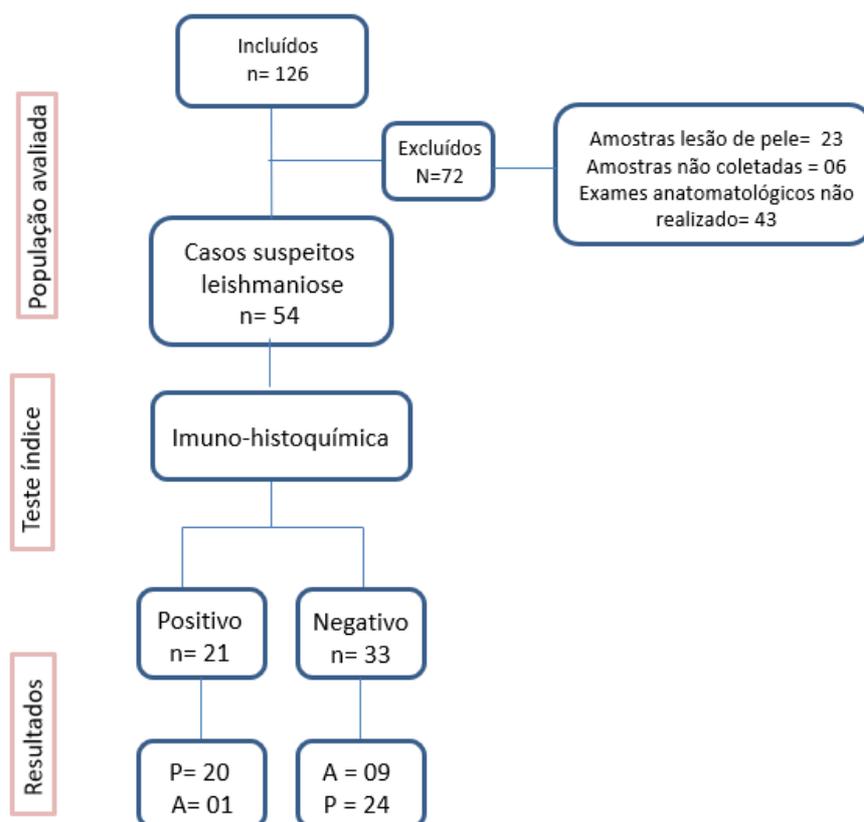
	<i>qPCR Syber</i>	<i>qPCR TaqMan</i>
<i>qPCR TaqMan</i>	S: p=0,1488 E: p=1,000 A: p=0,1965	
<i>cPCR HSP70</i>	S: p<0,0001 E: p=0,991 A: p<0,0001	S: p<0,0001 E: p=0,1991 A: p=0,0020

Legenda: S: sensibilidade E: especificidade A: acurácia

### 5.5.2 Imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina

O anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina para uso no exame de IHQ teve desempenho avaliado em 54 amostras constituídas por fragmentos de biópsia da lesão mucosa, sendo 44 do grupo de pacientes com confirmação de leishmaniose e 10 amostras do grupo com outros diagnósticos (controle). A discrepância entre o número de amostras incluídas nesta avaliação e o número de pacientes com e sem o diagnóstico de leishmaniose no estudo clínico (Parte I) se deve a indisponibilidade de espécime clínico (tecido mucoso biopsiado), seja pela não realização de biópsia no CRL-IRR ou uso esgotamento do material em análises anteriores. A Figura 3 apresenta o resultado do exame de IHQ aplicado às amostras de casos e não-casos de leishmaniose.

**Figura 3. Avaliação da positividade da imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina entre casos de leishmaniose com comprometimento mucoso e controles, Belo Horizonte, 2017-2020**



Legenda: : P: condição presente A:condição ausente

Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados das medidas de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia global da imuno-histoquímica são apresentados na Tabela 14.

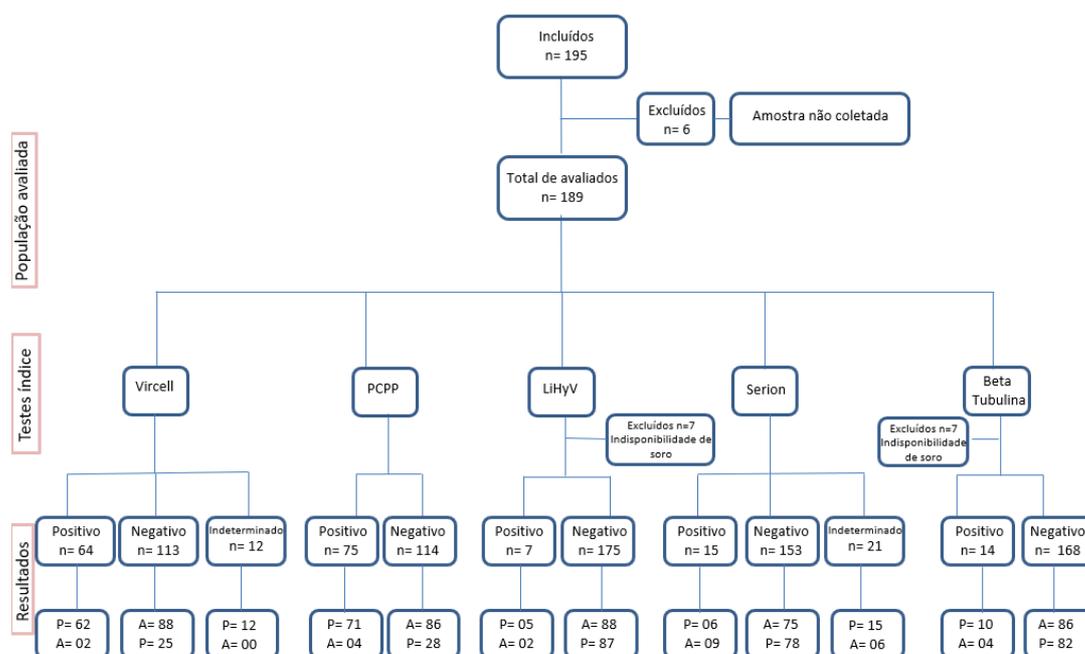
**Tabela 14. Sensibilidade, especificidade e acurácia da imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, Belo Horizonte, 2017-2020**

	Sensibilidade (%) IC <sub>95</sub> % (44)	Especificidade (%) IC <sub>95</sub> % (10)	Acurácia (%) IC <sub>95</sub> % (54)
<b>Imuno-histoquímica</b>	45,4 (30,4-61,1)	90,0 (55,5-99,7)	53,7 (39,6-67,4)

### **5.5.3 Imunoensaios comerciais e *in house* baseados em antígenos de *Leishmania* spp. aplicados ao diagnóstico da doença da leishmaniose com comprometimento mucoso – critério de positividade definido pelo fabricante/desenvolvedor**

Os resultados das medidas de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia diagnóstica dos testes sorológicos, segundo os critérios de positividade definidos pelos fabricantes (VIRCELL® e SERION®) e *cut-off* identificado pela média da absorbância do ensaio em controles somado a dois desvios-padrão da medida (para os imunoensaios com técnica *in house*) são apresentados na Figura 4 e Tabela 15.

**Figura 4. Avaliação da positividade dos testes de imunoensaio entre casos de leishmaniose com comprometimento mucoso e não casos, segundo critério de positividade informado pelo fabricante/desenvolvedor, Belo Horizonte, 2017-2020**



Fonte: elaborado pela autora

**Tabela 15. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos baseados em imunoenensaio para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, critério positividade definido pelo fabricante/desenvolvedor, Belo Horizonte, 2017-2020**

Testes sorológicos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
	IC <sub>95</sub> %	IC <sub>95</sub> %	IC <sub>95</sub> %
	(n)	(n)	(n)
<b>ELISA PCPP</b>	71,7 (61,8-80,3) (99)	95,6 (89,0-98,8) (90)	83,0 (76,9-88,1) (189)
<b>VIRCELL®</b>	62,3 (52,3-72,1) (99)	97,8 (92,2-99,7) (90)	79,4 (72,9-84,9) (189)
<b>β-TUBULINA</b>	10,9 (5,3-19,1) (92)	95,6 (89,0-98,8) (90)	52,7 (45,2-60,2) (182)
<b>LiHyV</b>	5,4(1,8-12,2) (92)	97,8 (92,2-99,7) (90)	51,1 (43,6-58,6) (182)
<b>SERION®</b>	21,2 (13,6-30,6) (99)	83,3 (74,0-90,4) (90)	50,8 (43,4-58,1) (190)

**Quadro 5. Significância estatística (valor de p) para as comparações de sensibilidade, especificidade e acurácia entre os diferentes testes sorológicos (complementa Tabela 15), Belo Horizonte, 2017-2020**

	<b>VIRCELL®</b>	<b>ELISA PCPP</b>	<b>LiHyV</b>	<b>SERION®</b>
<b>ELISA PCPP</b>	S: p=0,1606 E: p=0,4100 A: p=0,3710			
<b>LiHyV</b>	S: p<0,0001 E: p=1,0000 A: p<0,0001	S: p<0,0001 E: p=0,4100 A: p<0,0001		
<b>SERION®</b>	S: p<0,0001 E: p=0,0009 A: p<0,0001	S: p<0,0001 E: p=0,0078 A: p<0,0001	S: p=0,0015 E: p=0,0009 A: p=0,9539	
<b>β-TUBULINA</b>	S: p<0,0001 E: p=0,4100 A: p<0,0001	S: p<0,0001 E: p=1,0000 A: p<0,0001	S: p=0,1739 E: p=0,4100 A: p=0,7603	S: p=0,0544 E: p=0,0074 A: p=0,7143

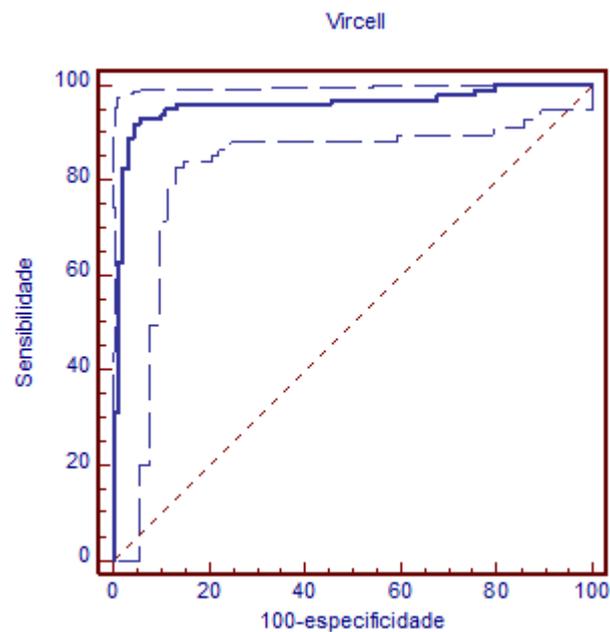
Legenda: S: sensibilidade E: especificidade A: acurácia

De forma sucinta, os testes VIRCELL® e ELISA PCPP apresentaram as maiores sensibilidades (71,7%, IC95%61,8-80,3% e 62,3%, IC95%52,3-72,1%), sem diferença significativa entre eles e superiores aos demais testes, sendo a especificidade de ambos superior a 95%. A sensibilidade para os demais testes foi precária, variando de 21,2 a 5,4%, apesar de alta especificidade apresentada pelos testes *in house* LiHyV e Beta-tubulina (acima de 95%).

#### 5.5.4 Imunoensaios comerciais e *in house* baseados em antígenos de *Leishmania* spp. aplicados ao diagnóstico da doença da leishmaniose com comprometimento mucoso - critério de positividade definido por curva ROC

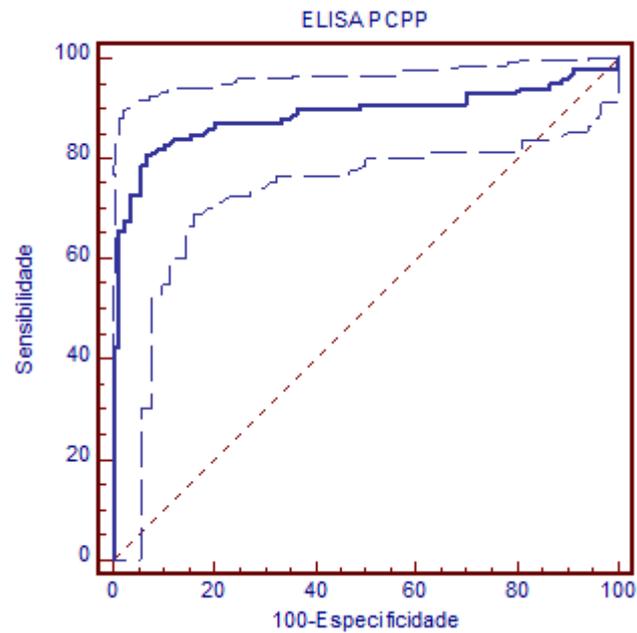
A seguir são apresentadas curvas ROC construídas com a população reunida neste estudo, para todos os testes sorológicos em avaliação. Além da estimativa da acurácia global dos testes, o que permite a comparação entre eles, a curva ROC permitiu a definição dos melhores pontos de corte para absorbância dos ensaios imunoenzimáticos e a estimativa do melhor desempenho possível, para cada teste, na população em questão.

Figura 5- Curva ROC para o teste ELISA VIRCELL®



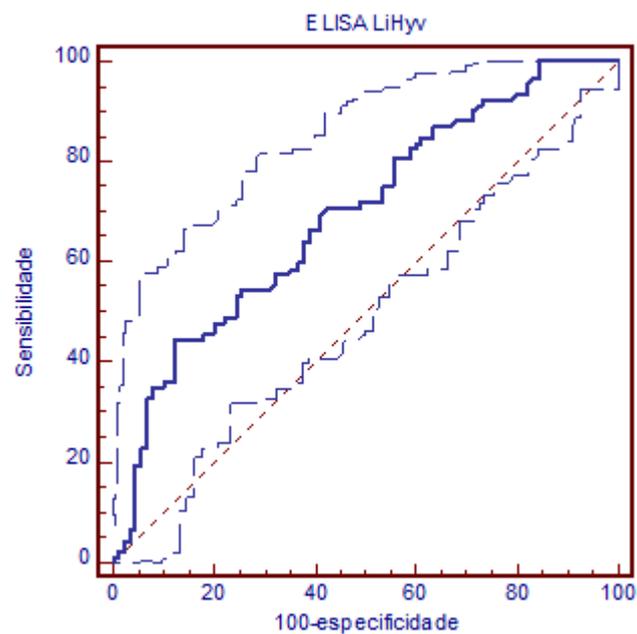
Área sob a curva ROC (IC95%): 0,957 (0,918-0,981)

**Figura 6 - Curva ROC para o teste ELISA *in house* ELISA PCPP**

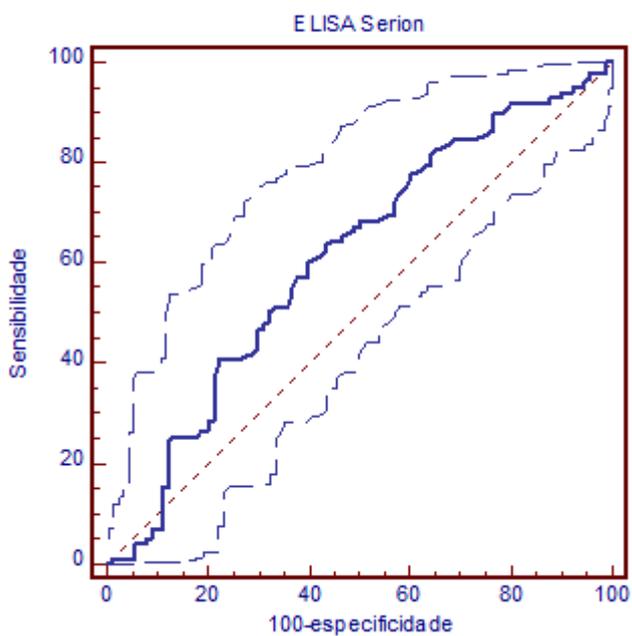


Área sob a curva ROC (IC95%): 0,887 (0,833-0,928)

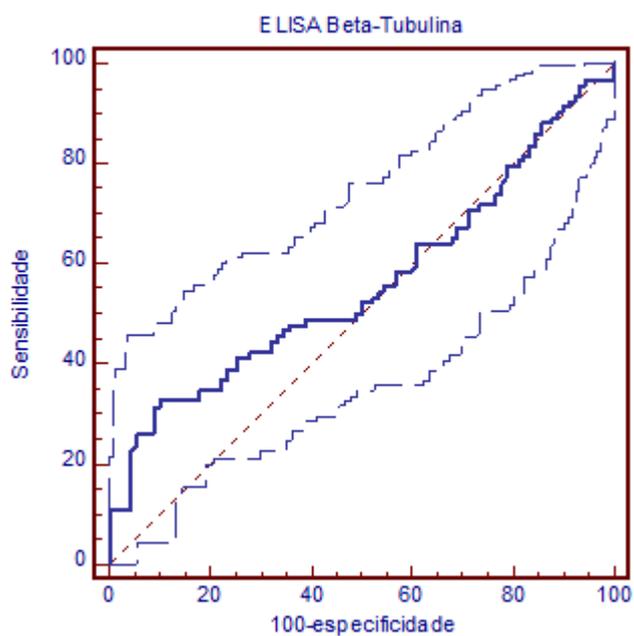
**Figura 7- Curva ROC para o teste ELISA *in house* LiHyV**



Área sob a curva ROC (IC95%): 0,694 (0,621-0,760)

**Figura 8- Curva ROC para o teste ELISA SERION®**

Área sob a curva ROC (IC95%): 0,608 (0,534-0,678)

**Figura 9 - Curva ROC para o teste ELISA *in house*  $\beta$ -Tubulina**

Área sob a curva ROC (95%): 0,559 (0,484-0,633)

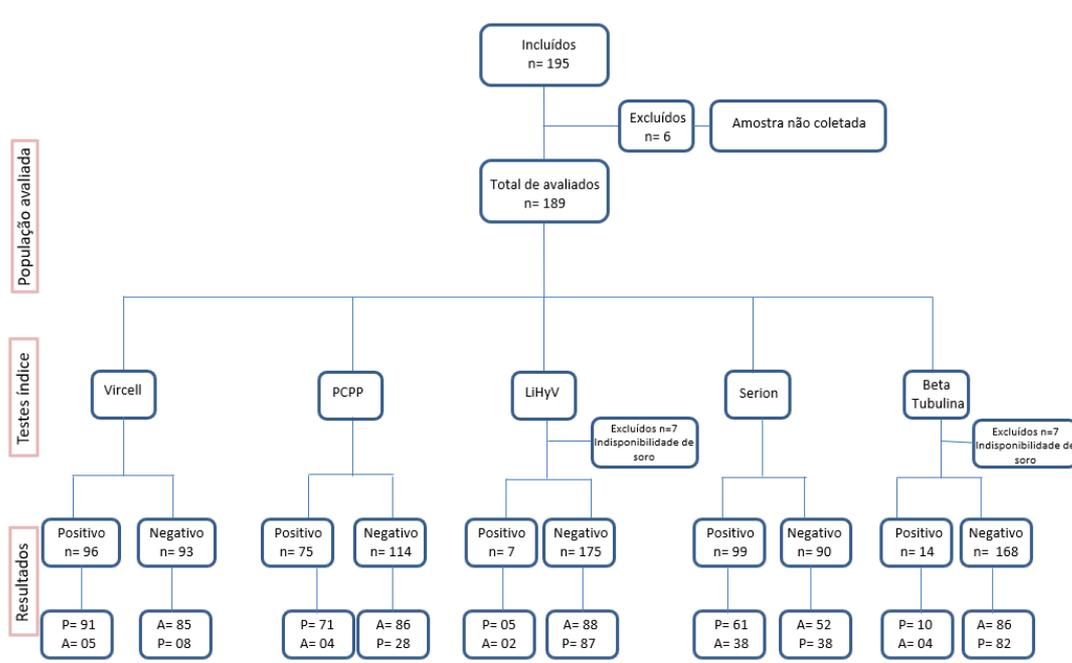
Os pontos de corte na absorvância que definem a melhor relação entre sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da leishmaniose com acometimento mucoso com os diferentes testes sorológicos analisados, estabelecidos por curva ROC, estão apresentados na Tabela 16, juntamente com os valores de absorvância indicados pelo fabricante ou desenvolvedor, quando disponível, como critério de positividade do teste.

**Tabela 16. Pontos de corte da absorvância do ELISA para definição de positividade dos testes, segundo informação do fabricante/desenvolvedor e definição por curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020**

Testes	Valor da absorvância	
	Critério definido pelo fabricante/desenvolvedor	Valor identificado por Curva ROC
VIRCELL®	Variável por placa	0,587
ELISA PCPP	0,274	0,214
LIHYV	0,806	0,434
SERION®	Variável por placa	0,140
β-TUBULINA	1,187	1,001

Com base nos novos pontos de corte para absorvância, definidos por curva ROC, foram realizadas novas estimativas das medidas de desempenho sensibilidade, especificidade e acurácia global para os testes sorológicos, tal como apresentado na Figura 10 e Tabela. 17. A maior sensibilidade foi observada para o teste VIRCELL® (91,9%, IC95% 84,7-96,5%, seguido do ELISA PCPP (80,81%, IC95%71,7-88,0%), sem diferença de especificidade entre eles.

**Figura 10 – Avaliação da positividade dos testes de imunoensaio entre casos de leishmaniose com comprometimento mucoso e controles, segundo critério de positividade estabelecido por curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020**



Legenda: : P: condição presente A: condição ausente

Fonte: elaborado pela autora.

**Tabela 17. Sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes sorológicos baseados em imunoenensaio para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso, critério positividade definido por curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020**

Testes sorológicos	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Acurácia (%)
	IC <sub>95</sub> %	IC <sub>95</sub> %	IC <sub>95</sub> %
	(n)	(n)	(n)
<b>VIRCELL®</b>	91,9 (84,7-96,5) (99)	94,4 (87,5-98,2) (90)	93,1 (88,5-96,3) (190)
<b>ELISA PCPP</b>	80,81 (71,7-88,0) (99)	92,22 (84,6-96,8) (90)	86,2 (80,5-90,8) (190)
<b>LiHyV</b>	35,9 (26,1-46,5) (92)	88,9 (80,5-94,5) (90)	62,1 (54,6-69,2) (182)
<b>SERION®</b>	61,6 (51,3-71,2) (99)	57,8 (46,9-68,1) (90)	59,8 (52,4-66,8) (190)
<b>β-TUBULINA</b>	31,5 (2,2-42,0) (92)	86,7 (77,9-92,9) (90)	58,8 (51,3-66,0) (182)

**Quadro 6. Significância estatística (valor de p) para as comparações de sensibilidade, especificidade e acurácia entre os diferentes testes sorológicos (complementa Tabela 17), Belo Horizonte, 2017-2020**

	<b>VIRCELL®</b>	<b>ELISA PCPP</b>	<b>LIHYV</b>	<b>SERION®</b>
<b>ELISA PCPP</b>	S: p=0,0256 E: p=0,5561 A: p=0,0275			
<b>LIHYV</b>	S: p<0,0001 E: p=0,1835 A: p<0,0001	S: p<0,0001 E: p=0,4505 A: p<0,0001		

<b>SERION®</b>	S: p<0,0001 E: p<0,0001 A: p<0,0001	S: p=0,0029 E: p<0,0001 A: p<0,0001	S: p=0,0004 E: p<0,0001 A: p=0,6499	
<b>β-TUBULINA</b>	S: p<0,0001 E: p=0,0783 A: p<0,0001	S: p<0,0001 E: p=0,2310 A: p<0,0001	S: p=0,5289 E: p=0,6529 A: p=0,5203	S: p<0,0001 E: p<0,0001 A: p=0,8446

Legenda: S: sensibilidade E: especificidade A: acurácia

A comparação entre a acurácia dos testes foi também realizada através da análise das áreas sob a curva ROC, tal como apresentado na Tabela 18 e Quadro 7. Segundo o critério área, os desempenhos dos testes foram significativamente diferentes, exceto para o ELISA baseado na proteína LiHyV e o teste comercial SERION®, com a seguinte ordem decrescente de acurácia: VIRCELL®, ELISA PCPP, LiHyV/SERION® e ELISA baseado na proteína β-Tubulina.

**Tabela 18. Estimativa do desempenho dos testes sorológicos de acordo com área sob a curva ROC, Belo Horizonte, 2017-2020**

<b>Testes avaliados</b>	<b>Área sob a curva ROC (IC95%)</b>
<b>VIRCELL®</b>	0,957 (0,918-0,981)
<b>ELISA PCPP</b>	0,887 (0,833-0,928)
<b>LiHyV</b>	0,694 (0,621-0,760)
<b>SERION®</b>	0,608 (0,534-0,678)
<b>β-TUBULINA</b>	0,559 (0,484-0,633)

**Quadro 7. Significância estatística (valor de p) para as comparações da área sob a curva ROC entre os diferentes testes sorológicos (complementa Tabela 18), Belo Horizonte, 2017-2020**

	<b>VIRCELL®</b>	<b>ELISA PCPP</b>	<b>LiHyV</b>	<b>SERION®</b>
<b>ELISA PCPP</b>	p=0,0146			
<b>LiHyV</b>	p<0,0001	p=0,0001		
<b>SERION®</b>	p<0,0001	p<0,0001	p=0,1385	
<b>β-TUBULINA</b>	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0226	p=0,4061

## 6 DISCUSSÃO

Em pouco mais de quatro anos desde o início de uma coorte, 102 pacientes com leishmaniose e comprometimento mucoso foram reunidos, permitindo essa primeira avaliação que representa parte do esforço na construção de informações robustas e continuadas sobre a doença. Estudos sobre a forma mucosa da leishmaniose enfrentam grandes desafios. Além do baixo grau de investimento, o número de casos relativamente pequeno, em relação ao total de casos de LT, dificulta o recrutamento de pacientes e torna os centros de referência ainda mais responsáveis pela produção das evidências necessárias para sustentar recomendações de manejo da doença. No Brasil, são menos de 1.500 casos por ano caracterizados com a forma mucosa da leishmaniose, o que ainda assim se reveste de grande relevância diante da alta morbidade representada pela doença.

Nesta série, *L. braziliensis* foi confirmada como o agente predominante da leishmaniose como já relatado na literatura: 97,8% dos casos que tiveram espécie infectante identificada. Em análises realizadas na Colômbia MUVDI-ARENAS & OVALLE-BRACHO (2019b) observaram *L. braziliensis* em 88% das amostras e *L. guyanensis* em 2%. SOUZA CASTRO e colaboradores (2018) num estudo de caracterização de espécies de *Leishmania* em Mato Grosso do Sul encontraram 69,8% de pacientes infectados por *L. braziliensis*. O único paciente com doença causada por *L. guyanensis*, embora residente em Minas Gerais, relatou ter residido por vários anos no estado do Amazonas, região norte do Brasil, até o aparecimento das lesões. Importante ressaltar que esse paciente apresentava acometimento mucoso no contexto de doença cutânea disseminada, constatação importante também para corroborar o espectro clínico de doença causada pela espécie *L. guyanensis*. NAIFF; TALHARI; BARRETT (1988) isolaram *L. guyanensis* em três pacientes com leishmaniose mucosa na região norte de Manaus. Nesse estudo, um paciente (24 anos) apresentava a forma disseminada. Todos foram tratados com pentamidina com total cicatrização das lesões.

A principal observação deste estudo foi a confirmação de diferentes apresentações clínicas de leishmaniose com comprometimento mucoso, distintas em relação a aspectos demográficos, clínicos e prognósticos. Apesar da maior proporção dos pacientes apresentar algum acometimento cutâneo simultaneamente à lesão mucosa (51%), em 78,8% dos

pacientes, a pele acometida restringia-se às adjacências da mucosa alterada, sugerindo tratar-se de uma extensão por contiguidade. Outra observação é a tendência de lesões de pele contíguas às mucosas serem do tipo infiltrativa ou em placa (75,6%), diferentemente do observado em pacientes com lesões cutâneas à distância, em quem predominavam lesões ulceradas (63,6%). Entre todas as apresentações clínicas de comprometimento mucoso na leishmaniose tegumentar, a apresentação historicamente reconhecida como típica, aquela que acomete o nariz ou vias aero-digestivas altas, seja de forma isolada ou com alteração apenas da pele adjacente, representou 68% dos pacientes retratados nesta série (69/102). Segundo nossas observações, 57,8% dos pacientes com esta apresentação tinham idade acima de 60 anos, sendo a mediana de tempo de sintomas até a avaliação especializada de aproximadamente 12 meses e a taxa de falha terapêutica aos seis meses de seguimento três vezes maior do que a taxa do grupo com lesões de pele à distância (16,7% vs. 3,5%). Estes dados confirmam a existência de subgrupo com doença mucosa isolada, mediana de idade na 5ª década de vida e prognóstico menos favorável que as demais apresentações. Achado importante que não é relatado nas publicações científicas e que deveria constar nas recomendações do MS.

A predileção da leishmaniose pela mucosa nasal foi confirmada, presente em 89,2% dos casos em nossa casuística, como já amplamente observado na literatura. Em estudo avaliando 21 pacientes com leishmaniose com acometimento mucoso (DINIZ, COSTA & GONÇALVES (2011) encontraram 94% das lesões na mucosa nasal apenas ou em associação com a mucosa orofaríngea. Por outro lado, observamos que o acometimento isolado da mucosa oral foi raro nesta série de pacientes (11,8%), sugerindo que seu achado leve à investigação de outras possíveis etiologias.

Pacientes com doença restrita à mucosa relataram mais tempo de sintomas até a avaliação especializada (mediana de 12 meses) em comparação com pacientes com lesões de pele concomitantes, sendo tanto maior o número de lesões, menor o tempo de sintomas até a avaliação médica. A mesma observação, sobre o longo tempo de evolução da doença até o diagnóstico, se repetiu para subgrupos de pacientes com lesão de pele contígua à mucosa, 80% dos quais tinham o nariz como o local da doença, e nos pacientes com doença restrita ao nariz. Em todos os casos, a ausência de lesões visíveis na pele, com suas implicações sociais e psíquicas, possivelmente explicou o atraso na avaliação médica especializada. Adicionalmente, a observação pode refletir também a dificuldade do sistema de saúde de

detectar e investigar uma condição na maioria das vezes pouco acessível ao médico generalista, contando com os recursos disponíveis em unidades básicas de saúde.

Em que pese a inexistência de uma definição clara para a forma disseminada da leishmaniose, o limite de 10 lesões em diferentes segmentos corporais tem sido frequentemente usado por pesquisadores no Brasil (CARVALHO et al., 1994; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019; VERNAL et al., 2016) e no Velho Mundo (GELANEW et al., 2011). No CRL-IRR, esta é uma apresentação relativamente infrequente da leishmaniose cutânea. Além de associada a aspectos imunológicos do hospedeiro (TURETZ et al., 2002), a condição tem implicações terapêuticas diante da impossibilidade do uso de abordagens locais. Assim, com o intuito de conferir sensibilidade ao critério e para manter alinhamento com o protocolo terapêutico do serviço, no CRL-IRR, o limite de seis lesões de pele foi estabelecido como a definição operacional da forma disseminada da leishmaniose. Na presente análise, todas as comparações de subgrupos foram realizadas usando o critério de seis ou 10 lesões como o limite para a definição da forma disseminada, sem diferença nos resultados obtidos. Entre os pacientes incluídos na coorte, nove tinham mais de seis lesões de pele (7,1%), dos quais 3 tinham mais de 10 lesões (2,4%). A associação entre forma disseminada e comprometimento mucoso já foi avaliada por TURETZ et al. (2002) em estudo em Corte de Pedra (Bahia, Brasil), com *odds ratio* estimada em 34,2 (IC95% 14.18–78.28) em relação à forma cutânea da leishmaniose. De relevante, sobre os pacientes com múltiplas lesões de pele na nossa série, trata-se de subgrupo com mediana de idade significativamente menor em comparação com pacientes com até seis lesões cutâneas (44,5 vs. 62,0,  $p= 0,024$ ), caracterizando uma apresentação clínica distinta da forma restrita à mucosa.

Em nossa casuística, 26,5% dos pacientes com doença mucosa tinham passado de LC. Este percentual é menor que o encontrado em outras séries, nomeadamente 38% por DINIZ; COSTA; GONÇALVES (2011), 82,6% por GUERRA e colaboradores (2011) e 70% por (LLANOS-CUENTAS et al., 1984) o que pode refletir nossa estratégia ampliada para a definição da condição leishmaniose com comprometimento mucoso, que incluiu qualquer apresentação clínica com mucosa acometida, mesmo aquelas por outros classificadas como forma disseminada, ou formas cutâneas com extensão mucosa. Diferentes vieses de memória e aferição também podem explicar o menor percentual encontrado nesse trabalho.

As taxas de cura aqui descritas também diferem das esperadas para LM, refletindo uma abordagem intencionalmente conservadora na interpretação dos desfechos, prudência necessária a um desenho de estudo observacional e baseado na compilação de dados de registros médicos. Segundo o critério adotado, os desfechos de interesse (cura e falha terapêutica) foram computados para o total de pacientes que completaram o tratamento de leishmaniose, proposto após o diagnóstico, ou seja, as perdas durante o seguimento de cura permaneceram entre o total de casos tratados, o que tende a subestimar as taxas de cura. Esta abordagem provavelmente contribuiu para explicar as baixas taxas de cura encontradas em comparação com as descritas em revisão da literatura, estimada em 88% com antimoniato de meglumina por AMATO e colaboradores (2007). Por sua vez, estudo mais recente realizado por CUNHA e colaboradores (2015) encontrou eficácia de 93,1% em 29 pacientes tratados com anfotericina B lipossomal em São Paulo. Importante ressaltar que as taxas de cura aqui observadas não se alteraram significativamente em análise de subgrupo incluindo apenas os pacientes submetidos aos tratamentos recomendados pelo Ministério da Saúde do Brasil (AM, anfotericina B e miltefosina). De forma sucinta, 84,7% dos pacientes tratados apresentaram melhora na avaliação em D90, mas apenas 57,1% foram considerados curados na avaliação definitiva aos seis meses de seguimento (D180), quando 25,3% mantinham atividade da doença. Por sua vez, na avaliação realizada após um ano do tratamento, pouco mais da metade dos pacientes (50,5%) tiveram doença inativa confirmada. Estes números revelam o desafio do tratamento da leishmaniose com comprometimento mucoso, doença caracterizada por uma resposta lenta, tendência a recorrência e alto percentual de casos com resposta apenas parcial. Infelizmente o número de participantes e o desenho observacional deste estudo não permitem a comparação direta do desfecho cura entre os pacientes submetidos aos diferentes tratamentos. Condições clínicas tais com idade, presença de comorbidade e variação da apresentação da leishmaniose certamente determinaram a escolha do medicamento prescrito, com impacto direto na taxa de cura.

Sobre o desempenho dos diferentes métodos diagnósticos, dificuldade comum aos estudos com qualquer das formas de leishmaniose é a escolha do teste padrão ouro para a confirmação da doença. Apesar da alta especificidade do exame parasitológico, sua sensibilidade sub ótima tem representado o principal desafio nos estudos de acurácia. A reconhecida escassez parasitária, dificuldade técnica para a realização de biópsia de

mucosas e falta de otorrinolaringologistas nas unidades básicas de saúde aumentam a dificuldade de avaliação de testes para a leishmaniose com comprometimento mucoso.

Neste estudo, foi avaliado um teste diagnóstico em desenvolvimento por nosso próprio grupo de pesquisa, o ELISA com antígeno de *L. braziliensis* e testes em fase de desenvolvimento por outro grupo de pesquisa, e técnica de IHQ com anticorpo monoclonal anti-peroxidoxina e dois kits comerciais. Resultados prévios usando a plataforma ELISA justificaram a busca por tantos kits quantos fosse possível, sejam os comercialmente disponíveis, sejam aqueles em fase de validação clínica. Já os testes moleculares, o racional foi avaliar a equivalência ou superioridade de diferentes sequências genéticas (alvos) e variações na metodologia de execução da reação molecular, em relação ao teste convencional baseado em kDNA, em busca de melhor desempenho. Apesar do esforço, que incluiu a avaliação de desempenho dos testes sorológicos explorando dois critérios de positividade, poucas diferenças na reatividade aos testes foram observadas entre grupos de pacientes com diferentes apresentações clínicas, o que exige reflexão. Uma possibilidade seria que a hipótese norteadora deste trabalho esteja equivocada, ou seja, as diferentes manifestações clínicas de leishmaniose com comprometimento mucoso não determinariam comportamentos distintos frente aos testes diagnósticos. Outra possibilidade é que o estudo não tenha sido capaz de detectar diferenças, seja pelo pequeno tamanho amostral nos subgrupos, seja pelo agrupamento dos casos sem correspondência com suas verdadeiras similaridades.

Considerando os critérios de positividade definidos pelos fabricantes e desenvolvedores, dois imunoenaios, ELISA PCPP “*in house*” (antígenos de *L. braziliensis*) e o kit ELISA comercial VIRCELL<sup>®</sup> (antígenos de *L. infantum*) exibiram as maiores sensibilidades: 71,7% (IC95% 61,8-80,3) e 62,3% (IC95% 52,3-72,1), respectivamente, com especificidade de 95,6% (IC95% 89,0-98,8%) e 97,8% (IC95% 92,2-99,7%), para ambas as medidas não houve diferença estatística entre eles. Importante salientar a similaridade de desempenho para dois testes, mesmo que baseados em antígenos de diferentes espécies, com especial atenção ao fato de *L. infantum* não ser o agente etiológico da forma tegumentar da leishmaniose. Tal observação é, contudo, justificada, dada a similaridade genômica entre as várias espécies de *Leishmania* spp. Como exemplos desta constatação, utilizando um teste ELISA preparado com antígeno recombinante Hsp83 (rHsp83) de *L. infantum*, CELESTE e colaboradores (2014) encontraram 100% de sensibilidade em 14

pacientes com leishmaniose mucosa. Por sua vez, ROMERO e colaboradores (2005) também encontraram alto desempenho (98,2%) de testes sorológicos usando antígenos de *L. amazonensis* no diagnóstico de pacientes com doença causada por *L. braziliensis*. Ainda que antígenos espécie-específicos não sejam essenciais para o bom desempenho de um teste diagnóstico para leishmaniose, o uso de antígenos de *L. braziliensis*, em sua forma bruta, isolada ou recombinante, poderia ser o caminho mais lógico de um plano de desenvolvimento de teste imunológico para as LT nas Américas. Em revisão sistemática, FREIRE e colaboradores (2021) identificaram nove estudos avaliando o desempenho de 23 antígenos para o diagnóstico de leishmaniose mucosa, incluindo 19 proteínas recombinantes, três peptídeos sintéticos e uma proteína purificada. Nove destas proteínas são derivadas de *L. infantum* e 14 de *L. braziliensis*, confirmando estas espécies de *Leishmania* como as mais estudadas para o desenvolvimento de testes diagnósticos para LT.

O ELISA PCPP já havia sido avaliado previamente para o diagnóstico de pacientes com lesão em mucosa. Em sua dissertação, OLIVEIRA (2018) avaliou 60 soros de pacientes com suspeita de leishmaniose mucosa, tendo encontrado acurácia similar à observada neste estudo, de 73,3% (sensibilidade de 60% e especificidade de 100%). Por sua vez, JUNQUEIRA PEDRAS (2003), em uma amostra com 36 pacientes, descreveu 97% de sensibilidade e 71% de especificidade para o teste. Estas discrepâncias sugerem que fatores relacionados à padronização do imunoensaio, ou diferenças ainda não identificadas entre os pacientes, podem resultar em variações significativas no desempenho do teste, indicando a necessidade de novas etapas de aprimoramento e validação. Um fator positivo a ser mencionado é a não ocorrência de reações falso positivas do ELISA PCPP com os soros dos três pacientes com paracoccidiodomicose, o principal diagnóstico diferencial da leishmaniose com acometimento mucoso. E, também, nenhuma reação cruzada com as amostras de 11 indivíduos saudáveis residentes em Belo Horizonte, área endêmica para LV, condição reconhecida como relacionada à perda de especificidade da sorologia para LT.

De especial importância foi a observação de diferença na positividade no teste ELISA PCPP entre subgrupos com diferentes apresentações clínicas nesta série: maior proporção de pacientes reativos ao ELISA PCPP foi observada entre pacientes com múltiplas lesões cutâneas e não contíguas (92,7%) em relação aos pacientes com doença restrita ao nariz

(72,4%). Trata-se, o primeiro grupo, justamente de pacientes mais jovens (sem diferença estatística) e com menor tempo de doença (8 vs. 12 meses), o que suscita duas possíveis explicações: a primeira relacionada à maior carga parasitária gerando resposta humoral mais potente, seja por se tratar de pacientes com formas mais exuberantes da doença, seja por estarem em fase mais precoce após a infecção. Já a segunda estaria associada a uma resposta imune mais vigorosa produzida por pacientes mais jovens, capaz de gerar altos títulos de anticorpos. Entretanto, diferentemente, VALLI e colaboradores (1999), utilizando antígenos de *L. braziliensis* e *L. mexicana*, encontraram média de densidade óptica significativamente maior no grupo de pacientes com leishmaniose mucosa em relação à média encontrada entre pacientes com LC. Os autores sugerem que os altos níveis de anticorpos IgG presentes entre pacientes com lesão mucosa se devem exatamente ao maior tempo de evolução da doença. Estas são apenas tentativas de explicação da observação, diante da impossibilidade de atestar assertivamente os determinantes da evolução clínica e do comportamento dos diferentes grupos de pacientes frente aos testes diagnósticos. Sem uma explicação documentada para o fenômeno, tais discrepâncias apenas confirmam toda a heterogeneidade presente nos estudos de leishmaniose.

Os demais testes sorológicos avaliados apresentaram resultados de acurácia em torno de 50%, mesmo usando o critério de positividade estabelecido por curva ROC com a própria amostra deste estudo, o que tende a produzir o melhor desempenho possível. No geral, o baixo desempenho e as diferenças entre os testes revelam a dificuldade de desenvolvimento de um teste sorológico para LT, confirmando a ausência de um padrão de resposta humoral, comportamento diverso do observado para a forma visceral. Ainda sobre o desempenho dos cinco testes sorológicos avaliados, apesar da inexistência de parâmetros mínimos de desempenho estabelecidos como necessários para um teste diagnóstico na leishmaniose tegumentar, é possível afirmar que nenhum dos avaliados alcançou acurácia razoável para ser usado. Seja na avaliação de triagem de casos suspeitos (quando se deseja uma sensibilidade o mais próxima possível de 100%), seja na confirmação diagnóstica (quando se deseja uma especificidade o mais próxima possível de 100%). Importante ressaltar que aspectos metodológicos podem ter influenciado esses resultados. O pequeno número de pacientes com suspeita de leishmaniose e confirmação de outra doença (grupo de não-casos = 24) exigiu o uso de painel sorológico comercial para compor o grupo controle. Embora a estratégia tenha corrigido a limitação amostral, é necessário reconhecer que não são controles ideais em um estudo de acurácia, pois não representam de forma fidedigna a

população alvo em quem o teste será realizado, para esclarecimento de comprometimento mucoso. Como exemplo, seis dos sete soros com resultados falso positivos para o teste ELISA PCPP eram soros com marcadores para Zika vírus (uma amostra), hepatite B (uma amostra) e dengue (quatro amostras) adquiridos comercialmente. Avaliação das 24 amostras de soro do grupo não casos revelou especificidade elevada, variando de 100 a 83,3%. Estes resultados precisam ser confirmados em outros estudos, com um número maior de amostras.

Os métodos moleculares vêm sendo cada vez mais utilizados para o diagnóstico de doenças infecciosas e identificação de patógenos pela, em geral, alta sensibilidade e especificidade. Um dos aspectos mais críticos para o desenvolvimento de um teste molecular é a escolha do alvo antigênico, pois envolve reconhecimento de toda diversidade e especificidade das sequências, sua variabilidade, repetibilidade e grau conservação entre espécies de *Leishmania* (CONTER et al., 2019). Portanto, a escolha correta do alvo para o desenho dos iniciadores influencia diretamente o desempenho da técnica. Nesse estudo foram avaliadas três tecnologias distintas: qPCR sistema de detecção Syber para kDNA, qPCR sistema de detecção Taqman para SSU rRNA e PCR convencional para o gene hsp70.

Duas técnicas de PCR apresentaram valores de acurácia comparáveis neste estudo, a qPCR Syber kDNA (91,8% de acurácia, sensibilidade de 93% e especificidade de 85,75%) e a qPCR Taqman SSU rRNA (85,9% de acurácia, com sensibilidade de 85,9% e especificidade de 85,7%). São técnicas que utilizam alvos ou sequência gênicas significativamente diferentes: enquanto a primeira consiste em aproximadamente 10.000 cópias de mini círculos de kDNA do cinetoplasto, a segunda é representada por 20 a 400 cópias do gene SSU-rRNA (CONTER et al., 2019). Já a técnica cPCR hsp70, que exibiu a menor acurácia, 66,7% (sensibilidade e especificidade de 64%), baseia-se na detecção da região gênica codificadora da proteína 70 de choque térmico (hsp70) no DNA de *Leishmania* e que possui entre uma e quinze cópias, dependendo da espécie. Outros resultados já publicados com estas técnicas diferiam dos aqui obtidos. Em estudo avaliando 13 pacientes com leishmaniose mucosa, GOMES et al., (2017) encontraram 69% de sensibilidade e 100% de especificidade para o qPCR Syber kDNA. Utilizando o sistema TaqMan kDNA, os mesmos autores encontraram 46% de sensibilidade. É importante ressaltar que foram utilizados *primers* diferentes dos empregados nesse trabalho. Por sua vez, FILGUEIRA et al. (2020) avaliaram a cPCR hsp70, também com *primer* diferente do

utilizado por nós, e encontraram 77% e 75% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, num estudo com 21 amostras de pacientes com leishmaniose mucosa. Contudo, a falta de padronização das técnicas de PCR impede a plena interpretação destas diferenças de desempenho e reduzem a validade externa das comparações. Por outro lado, estas análises são úteis na busca constante do CRL-IRR pela validação e implementação de métodos de alto desempenho para uso na atividade assistencial e em pesquisa.

Ponto importante a ser mencionado é a identificação de duas amostras de mucosa de pacientes classificados como controles (outro diagnóstico) com resultado positivo nas técnicas moleculares em avaliação, o que justifica a especificidade apresentada para as técnicas. Os dois casos foram positivos em duas técnicas: um paciente com diagnóstico parasitológico confirmado de hanseníase teve resultados positivos para qPCR Syber kDNA e TaqMan kDNA. Foi tratado para *Mycobacterium leprae* e evoluiu com melhora completa das lesões mucosas. O outro paciente, com apresentação infiltração discreta na mucosa nasal e relato de sintomas nasais recorrentes, teve o diagnóstico de leishmaniose descartado por ocasião de sua avaliação diante dos resultados iniciais negativos e desaparecimento completo dos sinais e sintomas nasais sem qualquer tratamento, tendo tido diagnóstico clínico presuntivo de rinite recorrente. No âmbito deste estudo, a amostra foi submetida às três técnicas com resultado positivo em todas elas, nomeadamente qPCR Syber kDNA, TaqMan kDNA e cPCR hsp70. O paciente foi reavaliado após conhecimento destes resultados e se encontrava assintomático, sendo proposto um seguimento frequente em longo prazo. Nos dois casos, a positividade em mais de um teste suscita a possibilidade de uma verdadeira infecção por *Leishmania* possivelmente assintomática, ou seja, não relacionada às manifestações apresentadas. Situação descrita por (CANÁRIO et al., 2019) que detectaram DNA do parasito, em mucosa nasal clinicamente saudável, em 7,8 (12/153), sugerindo um tropismo precoce de *L. braziliensis* para a mucosa nasal. Sob essa perspectiva, a perda de especificidade seria justamente relacionada à alta sensibilidade do teste molecular, o que implica no reconhecimento das limitações de sua aplicação em área de alta transmissão de leishmaniose.

Por fim, em relação à IHQ, proporção significativamente menor de casos positivos ao método foi observada em grupo de pacientes com lesão mucosa exclusiva (41,4%), em comparação com a proporção de positividade entre pacientes com acometimento cutâneo simultâneo (53,3%), grupo com menor tempo de sintomas (8 meses) e possivelmente

associado a carga parasitária mais alta, o que em tese aumentaria a chance de identificação do parasito pela IHQ. Até o momento, esse é o primeiro estudo que avaliou o desempenho da técnica para o diagnóstico de pacientes com leishmaniose com acometimento mucoso utilizando anticorpos monoclonais anti *L. braziliensis*. A acurácia da técnica foi de 53,7% (sensibilidade de 45,4% e especificidade de 90%). Apesar da baixa sensibilidade em comparação com o PCR - teste de referência, e das questões logísticas envolvidas na execução de um exame que exige a realização de biópsia, é preciso notar o acréscimo promovido pela técnica em relação ao exame histológico padrão, sobretudo em lesões contendo poucos parasitos, o que torna sua incorporação como uma ferramenta adicional para a otimização da capacidade diagnóstica em locais que contam com o exame anatomopatológico como única estratégia para confirmação da LT, realidade em muitos municípios de Minas Gerais. Esta mesma observação de acréscimo de positividade com a IHQ já foi realizada por outros autores. Utilizando anticorpos policlonais de *L. braziliensis panamensis*, SALINAS e colaboradores (1989) obtiveram 61,3% de positividade utilizando peroxidase vs. 34,6% da histopatologia em 250 pacientes com LC e 10 pacientes com lesões mucocutâneas. Em outro estudo, em amostras de 48 pacientes com LC, GONZALEZ e colaboradores (2019) utilizando anticorpos policlonais de *L. amazonensis* encontraram 76,1% vs. 50% de positividade para a IHQ comparada com a histopatologia.

De forma resumida, nossas observações sugerem a existência de ao menos dois grupos de pacientes com comprometimento mucoso por leishmaniose, aqueles com lesão mucosa exclusiva ou com acometimento simultâneo de pele limitado à adjacência da mucosa, e um grupo com lesões de pele à distância. O primeiro grupo apresenta maior mediana de idade, geralmente se apresenta com mais tempo de sintomas, tem menor probabilidade de ter seu diagnóstico confirmado histologicamente, mesmo com auxílio do método de imunohistoquímica e chance de falha terapêutica três vezes maior do que pacientes do segundo grupo, mais jovem, que procura assistência médica especializada com menos tempo de sintomas, tem lesões de pele e maior probabilidade de cura aos 180 dias com o tratamento específico. Neste grupo mais jovem e com menos tempo de sintomas, aparentemente o teste sorológico que utiliza antígenos de *L. braziliensis* foi mais sensível em indicar a presença da infecção que no grupo com a forma mais tardia. Estes são resultados precisam ser confirmados em maior número de pacientes e em outras séries, mas corroboram a possibilidade de marcadores sorológicos auxiliarem no diagnóstico da leishmaniose tegumentar com comprometimento mucoso. Por fim, um aspecto a ser discutido seria a

pertinência de uma abordagem terapêutica comum para estes dois grupos de pacientes, com a forma mucosa restrita ou acompanhada por lesões de pele à distância. No CRL-IRR, os pacientes com acometimento mucoso, independente da forma clínica, têm sido tratados como pacientes com a forma mucosa tardia, com esquemas terapêuticos que envolvem dose e tempo maiores.

Este estudo tem várias limitações. Apesar do esforço em reunir uma população representativa dos casos suspeitos de leishmaniose com comprometimento mucoso e usar uma abordagem de testagem em paralelo, por tratar-se de doença com prevalência baixa, o número amostral final impõe cautela na interpretação dos resultados. Além disso, sendo o local do estudo um centro de referências para leishmaniose, um pequeno número de pacientes com outras etiologias justificando o comprometimento mucoso era esperado. Esta situação gerou desproporção entre casos e não-casos, limitando a análise de desempenho de testes diagnósticos, o que foi parcialmente contornado pelo uso de painel de soros comerciais para compor o grupo controle na avaliação de acurácia dos testes sorológicos. Os subgrupos de pacientes com as diferentes apresentações clínicas são ainda pequenos. Além disto, os espécimes clínicos não foram suficientes para a execução de todos os testes em avaliação em toda população do estudo. Apesar de protocolo padronizado de coleta de dados implantado na rotina assistencial, a busca de informações evolutivas em registros médicos também pode ter gerado imprecisões e algumas perdas de informação, tais como na definição da cronologia das lesões de pele e mucosa. Por fim, o desenho observacional impede uma comparação direta de variáveis evolutivas entre pacientes submetidos aos vários tipos de tratamentos, dadas as diferenças não controladas entre estes grupos que poderiam influenciar os desfechos.

Como uma síntese de nossas observações sobre o desempenho das três metodologias moleculares estudadas nesse trabalho, a qPCR sistema Syber e a TaqMan kDNA foram as que apresentaram o melhor desempenho para o diagnóstico da leishmaniose com comprometimento mucoso. Porém, são técnicas que exigem laboratórios de complexidade alta o que inviabiliza o uso fora dos grandes centros urbanos. Dos testes imunológicos, ELISA VIRCELL® e ELISA PCPP foram, comparativamente, aqueles com os melhores desempenhos, mas não alcançaram acurácia suficiente para sua incorporação imediata à prática, sendo necessário novos estudos em outras populações antes de serem incorporados aos algoritmos diagnósticos da leishmaniose com acometimento mucoso, possivelmente

em combinação com outros testes. Por fim, apesar da baixa sensibilidade isolada, a IHQ consiste em ferramenta complementar ao exame histológico, facilitando a identificação da amastigota.

Infelizmente estes resultados não são suficientes para a proposição de um algoritmo para abordagem específica e sistematizada para pacientes com suspeita de leishmaniose com lesão mucosa em diferentes manifestações. Entretanto, as observações deste estudo reforçam a necessidade da distinção de ao menos duas formas clínicas da doença, que teriam na presença de lesões de pele à distância o melhor critério para sua diferenciação. Como proposição para a vigilância e para a pesquisa, estas diferentes apresentações de leishmaniose com lesão mucosa precisariam ser claramente identificadas, a fim de gerar os dados de morbidade necessários para uma futura recomendação de manejo baseada em evidências.

A gravidade do acometimento mucoso na leishmaniose é significativa, tendo em vista comprometimento funcional e a estigma social provocados. A deformação resultante da destruição mucosa só muito raramente pode ser passível de correção cirúrgica e deixa ao paciente a saga de conviver com a disfunção das vias aéreas superiores e seus consequentes processos infecciosos, ou com deglutição quase impossibilitada pelo desvio do alimento para o trato respiratório e suas dramáticas complicações. Menos grave, do ponto de vista funcional, mas não menos importante, do ponto de vista social, é a mutilação da face. Uma das estratégias para minimizar estes danos é o acesso ao diagnóstico oportuno e a oferta de tratamento adequado e seguro. Estes resultados devem se juntar a outros e auxiliar no reconhecimento das principais características clínicas e prognósticas de pacientes acometidos por leishmaniose com comprometimento mucoso na busca por uma abordagem mais específica e eficiente. Em última análise, no alcance da melhoria da vida dos pacientes com leishmaniose e lesão mucosa.

## 7 CONCLUSÕES

São conclusões deste estudo:

1. Existem ao menos duas apresentações clínicas de leishmaniose com comprometimento mucoso: uma forma caracterizada por lesão mucosa exclusiva ou com acometimento simultâneo de pele limitado à adjacência da mucosa, acometendo adultos na 5ª década de vida, mediana de 12 meses de sintomas, menor probabilidade de ter seu diagnóstico confirmado histologicamente, mesmo com auxílio do método de imuno-histoquímica e risco de falha terapêutica três vezes maior do que o outro, caracterizado por lesão mucosa acompanhada por lesões de pele à distância, mais jovem e maior probabilidade de cura aos 180 dias com o tratamento específico;
2. Entre cinco testes sorológicos avaliados, os imunoenaios ELISA PCPP *in house* (antígenos de *L. braziliensis*) e o kit ELISA comercial VIRCELL® (antígenos de *L. infantum*) exibiram as maiores sensibilidades para o diagnóstico de leishmaniose com comprometimento mucoso: 71,7% (IC95% 61,8-80,3) e 62,3% (IC95% 52,3-72,1), respectivamente, com especificidade de 95,6% (IC95% 89,0-98,8%) e 97,8% (IC95% 92,2-99,7%), para ambas as medidas não houve diferença estatística entre os testes;
3. Em comparação com teste de referência representado pelo exame parasitológico ou PCR convencional baseado em kDNA, as técnicas de PCR em tempo real Syber kDNA e Taqman SSU rRNA apresentaram desempenho similar: 91,8% de acurácia (sensibilidade de 93% e especificidade de 85,75%) e 85,9% de acurácia (sensibilidade de 85,9% e especificidade de 85,7%), respectivamente;
4. A acurácia da técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti *L. braziliensis* foi de 53,7% (sensibilidade de 45,4% e especificidade de 90%);

5. As comparações entre os subgrupos de pacientes com as diferentes formas clínicas de leishmaniose com lesão mucosa não permitiram a proposição de um algoritmo para abordagem específica e sistematizada dos pacientes.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ADAMS, E. R. et al. Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of Leishmania Parasites in Clinical Samples. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 591–596, 2010.

ADAMS, E. R. et al. Development and Evaluation of a Novel Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Diagnosis of Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 7, p. e00386-18, 2018.

AL-JAWABREH, A. et al. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: A comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. **Acta Tropica**, v. 99, n. 1, p. 55–61, 2006.

AMATO, V. S. et al. An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunohistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 1, p. 25–30, 1998.

AMATO, V. S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266–274, 2007.

AZULAY, R. D. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar. **Dermatol Iber**. v. 2, p. 7–15, 1960.

BARROSO-FREITAS, A. P. T. et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383–389, 2009.

BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.

BEZERRA, J. M. T. et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006697, 2018.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 51–56, 1991.

BOURREAU, E. et al. Presence of Leishmania RNA Virus 1 in Leishmania guyanensis Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 1, p. 105–111, 1, 2016.

BRASIL, M. DA SAÚDE. S. DE V. EM SAÚDE. D. DE V. DAS D. TRANSMISSÍVEIS. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. p. 191, 2017.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **Relatório de Recomendação. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar.** CONITEC, 2018.

BRAZ, L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61, 11, 2019.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 2, p. 318–321, 2000.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15, 2018.

CABELLO, I.; CARABALLO, A.; MILLÁN, Y. Leishmaniasis in the genital area. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 2, p. 105–107, 2002.

CANÁRIO, A. et al. Presence of parasite DNA in clinically unaffected nasal mucosa during cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* | **Elsevier Enhanced Reader**. v. 25, p. 515.e5e515.e7, 2019.

CANTANHÊDE, L. M. et al. Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004079, 2015.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994.

CASALLE, N. et al. Mucocutaneous Leishmaniasis with Rare Manifestation in the Nasal Mucosa and Cartilage Bone Septal. **Case Reports in Infectious Diseases**, v. 2020, p. 8876020, 2020.

CELESTE, B. J. et al. Recombinant *Leishmania infantum* Heat Shock Protein 83 for the Serodiagnosis of Cutaneous, Mucosal, and Visceral Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 5, p. 860–865, 2014.

COHEN, J. F. et al. STARD 2015 guidelines for reporting diagnostic accuracy studies: explanation and elaboration. **BMJ Open**, v. 6, n. 11, p. e012799, 2016.

CONTER, C. C. et al. PCR primers designed for new world *Leishmania*: A systematic review. **Experimental Parasitology**, v. 207, p. 107773, 2019.

COONS, A. H.; CREECH, H. J.; JONES, R. N. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. **Experimental Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 200–202, 1941.

COSTA, L. E. et al. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 39–45, 2016.

CRUZ, A. F. et al. Mucosal leishmaniasis in Brazilian patients: two case reports with similar clinical presentation and different approaches. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 122, n. 6, p. e199–e203, 2016.

CUBA, C. C. et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia - Brazil: an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. I. Laboratory diagnosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, n. 4, p. 161–167, 1984.

CUNHA, M. A. et al. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 6, p. 1214–1218, 2015.

DA SILVA, L. A. et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 77–83, 2010.

DATASSUS. Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/>. Acesso em: 13 abr. 2021.

DE CARVALHO, R. V. H. et al. *Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 5273, 21, 2019.

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. **Parasitology Research**, v. 109, n. 3, p. 927–933, 2011.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, p. 31, 17 2015.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463–469, 1994.

DINIZ, J. L. C. P.; COSTA, M. O. DA R.; GONÇALVES, D. U. Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. **Braz J Otorhinolaryngol.**, v.77(3), p.380-4, 2011.

DISCH, J. et al. *Leishmania* (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 51, n. 3, p. 185–190, 1, 2005.

DUARTE, M. C. et al. Proteins Selected in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, 2015.

FABER, W. R. et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 49, n. 1, p. 70–74, 2003.

FILGUEIRA, C. P. B. et al. Comparison and clinical validation of qPCR assays targeting *Leishmania* 18S rDNA and HSP70 genes in patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008750, 2020.

FRANKE, E. D. et al. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, n. 12, p. 934–940, 15, 1990.

FRANKE, E. D. et al. Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (Pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 77–82, 1994.

FREIRE, M. L. **Técnica de imuno-histoquímica utilizando anticorpo monoclonal para o diagnóstico da leishmaniose cutânea: identificação de alvos antigênicos, desenvolvimento e validação.** Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, p. 171.2021.

FREIRE, M. L. et al. Potential antigenic targets used in immunological tests for diagnosis of tegumentary leishmaniasis: A systematic review. **PLOS ONE**, v. 16, n. 5, p. e0251956, 27, 2021.

GALLUZZI, L. et al. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2018.

GALVÃO, E. L.; RABELLO, A.; COTA, G. F. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PloS One**, v. 12, n. 10, p. e0186117, 2017.

GELANEW, T. et al. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis Resembling Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Caused by *Leishmania donovani* in Three Patients Co-Infected with Visceral Leishmaniasis and Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome in Ethiopia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 6, p. 906–912, 2011.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, p. 701–709, 2014.

GOMES, C. M. et al. Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: systematic literature review and meta-analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 157–165, 2015.

GOMES, C. M. et al. Field Validation of SYBR Green- and TaqMan-Based Real-Time PCR Using Biopsy and Swab Samples To Diagnose American Tegumentary Leishmaniasis in an Area Where *Leishmania (Viannia) braziliensis* Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 526–534, 2017.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71–80, 2003.

GONZALEZ, K. et al. Performance of immunohistochemistry as a useful tool for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Panama, Central America. **Parasitology International**, v. 71, p. 46–52, 2019.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GRAÇA, G. C. DA et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–674, 2012.

GUERRA, J. A. DE O. et al. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e980, 2011.

GUERREIRO, J. B. et al. Mucosal Leishmaniasis: Quantitative Nasal Cytology as a Marker of Disease Activity and Indicator of Healing. v. 109, n. 1, p. 89–94, 2000.

GUIMARÃES, L. H. et al. Clinical Aspects of Tegumentary Leishmaniasis. v. 75, n. 1, p. 66–74, 2005.

HARRIS, E. et al. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1989–1995, 1998.

HARTLEY, M.-A. et al. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 412–422, 2014.

HO, M. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis. **A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis.**, v. 35, n. 5, p. 943–946, 1983.

JUNQUEIRA PEDRAS, M. et al. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 3, p. 477–485, 2003.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LEÓN, C. M. et al. Analytical Performance of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for *Leishmania* DNA Detection in Sandflies and Direct Smears of Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 1325–1331, 2018.

LESSA, H. A. et al. A proposed new clinical staging system for patients with mucosal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 6, p. 376–381, 2012.

LIMA, B. S. S. et al. A proteomic road to acquire an accurate serological diagnosis for human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 174–181, 2017.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Efficacy of sodium stibogluconate alone and in combination with allopurinol for treatment of mucocutaneous leishmaniasis. **Clinical**

**Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 25, n. 3, p. 677–684, 1997.

LLANOS-CUENTAS, E. A. et al. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8397, p. 295, 4, 1984.

LOWRY, O. et al. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT - ScienceDirect. v. 193, p. 265–275, 1951.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, p. 09–16, 2019.

MACHADO, P.; PENNA, G. Miltefosine and cutaneous leishmaniasis : Current Opinion in Infectious Diseases. v. 25, n. 2, p. 141–144, 2012.

MAGALHÃES, A. V. DE et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 4. Classificação histopatológica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, p. 421–430, 1986.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escemel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p. 859–876, 1986.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Epitope Mapping of the HSP83.1 Protein of *Leishmania braziliensis* Discloses Novel Targets for Immunodiagnosis of Tegumentary and Visceral Clinical Forms of Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 21, n. 7, p. 949–959, 2014a.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Mapping B-cell epitopes for the peroxidoxin of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and its potential for the clinical diagnosis of tegumentary and visceral leishmaniasis. **PLoS one**, v. 9, n. 6, p. e99216, jun. 2014b.

MEREDITH, S. E. et al. Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. **Archives de l’Institut Pasteur de Tunis**, v. 70, n. 3–4, p. 419–31, 1993.

MESA, L. E. et al. Test accuracy of polymerase chain reaction methods against conventional diagnostic techniques for Cutaneous Leishmaniasis (CL) in patients with clinical or epidemiological suspicion of CL: Systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007981, 2020.

MONTENEGRO, J. Cutaneous Reaction in Leishmaniasis. **Archives of Dermatology and Syphilology** v. 1, p. 323–330, 1926.

MUVDI-ARENAS, S.; OVALLE-BRACHO, C. Mucosal leishmaniasis: A forgotten disease, description and identification of species in 50 Colombian cases. **Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud**, v. 39, n. Supl. 2, p. 58–65, 2019.

NAIFF, R. D.; TALHARI, S.; BARRETT, T. V. Isolation of *leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, p. 529–530, 1988.

NAMAZI, M. J. et al. Identification of *Leishmania* species by high-resolution melting analysis in newly emerged foci in Sabzevar, northeast of Iran. **Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 191–196, 2021.

NOLDER, D. et al. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (*viannia*) in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 76(3), p. 573–578, 2007.

NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, p. 63e–663, 2000.

OLIVEIRA, D. **APLICABILIDADE DE TESTES SOROLÓGICOS PARA DIAGNÓSTICO DA FORMA MUCOSA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, p.83.2018.

OLIVEIRA, J. G. S. DE et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. v. 94, p. 55–59, 2005.

OLIVIER, M. Host-pathogen interaction: Culprit within a culprit. **Nature**, v. 471, n. 7337, p. 173–174, 2011.

OLIVIER, M.; ZAMBONI, D. S. *Leishmania Viannia guyanensis*, LRV1 virus and extracellular vesicles: a dangerous trio influencing the faith of immune response during muco-cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 66, p. 108–113, 2020.

OPAS. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. Organización Panamericana de la Salud, 2019a.

OPAS. **Leishmanioses - Informe Epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses Nº 7, p. 8, 2019b.

OPAS. **Leishmanioses - Informe Epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses No 9, p.11, 2020.

PEDRAS, M. J. Diagnóstico laboratorial das formas mucosa e muco-cutânea da leishmaniose tegumentar americana. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p. 100, 2002.

PEDRAS, M. J. et al. Mucosal leishmaniasis: the experience of a Brazilian referral center. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 3, p. 318–323, 2018.

PEREIRA, L. DE O. R. et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania RNA virus 1* infection in Brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 665–667, 2013.

PESSOA, S. B.; BARRETO, M. P. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2010.

PIRMEZ, C. et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1819–1823, 1999a.

PORTELLA, T. P.; KRAENKEL, R. A. Spatial–temporal pattern of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 86, 2021.

REED, S. G. Diagnosis of leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 471–478, 1996.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RIDLEY, D. S. et al. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 4, p. 508–514, 1980.

RODRIGUES, E. H. G. et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3572–6, 2002.

ROMERO, G. A. Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two years follow-up. **Treatment of mucosal leishmaniasis with aminosidine sulfate: results of two years follow-up**, v. 31, p. 511–516, 1998.

ROMERO, G. A. S. et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Acta Tropica**, v. 79, n. 3, p. 225–229, 2001.

ROMERO, G. A. S. et al. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Tropica**, v. 93, n. 1, p. 49–56, 2005.

SAGI, O. et al. Sensitive Molecular Diagnostics for Cutaneous Leishmaniasis. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. ofx037, 2017.

SALINAS, G. et al. Detección de amastigotas en Leishmaniasis cutánea y mucocutánea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con métodos convencionales de diagnóstico. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 53–60, 1989.

SALINAS, G. et al. *Leishmania* RNA viruses in *Leishmania* of the *Viannia* subgenus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 4, p. 425–429, 1996.

SAMPAIO, R. N. R. et al. A randomized, open-label clinical trial comparing the long-term effects of miltefosine and meglumine antimoniate for mucosal leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. e20180292, 2019.

SAMPAIO, R. N. R.; MARSDEN, P. D. Tratamento da forma mucosa de leishmaniose sem resposta a glucantime, com anfotericina B liposomal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 125–128, abr. 1997.

SANCHEZ-ROMERO, C. et al. Immunohistochemical and molecular diagnosis of mucocutaneous and mucosal leishmaniasis. **Int J Surg Pathol**, v.2, p.138-145, 2019.

SANTOS, C. R. et al. Comparative study on liposomal amphotericin B and other therapies in the treatment of mucosal leishmaniasis: A 15-year retrospective cohort study. **PLOS ONE**, v. 14, n. 6, p. e0218786, 2019.

SASSI, A. et al. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 116, n. 1, p. 127–132, 1999.

SCHALLIG, H. D. F. H. et al. Evaluation of point of care tests for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Suriname. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 25, 2019.

SCHUBACH, A. et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 987–996, 2001.

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.**, v. 69, n. 3, p. 323–335, 1975.

SKRABA, C. M. et al. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p. 437–444, 2015.

SOTO, J. et al. Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine | *Clinical Infectious Diseases* | Oxford Academic. v. 44, n. 3, p. 350–356, 2007.

SOTO, J. et al. Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 3, p. 387–389, 2009.

SOUZA CASTRO, L. et al. Characterization of *Leishmania* species from Central-West Region of Brazil. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1839–1845, 2018.

SOUZA, C. S. A. DE. **Análise temporal, espacial e fatores associados à mortalidade por leishmaniose tegumentar no Brasil.** Dissertação (Mestrado em Saúde Pública). Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz. Belo Horizonte, p. 105, 2018.

SOUZA, L. W. F.; SOUZA, S. V. T.; BOTELHO, A. C. C. Comparative analysis of the geographic distribution of the histopathological spectrum and *Leishmania* species of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, p. 369–374, 2012.

TELES, C. B. G. et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 60–66, 2013.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

VALLI, L. C. et al. Humoral immune responses among mucosal and cutaneous leishmaniasis patients caused by *Leishmania braziliensis*. **The Journal of Parasitology**, v. 85, n. 6, p. 1076–1083, 1999.

VAN EYS, G. J. J. M. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133–142, 1992.

VERALDI, S. et al. Leishmaniasis of the eyelid mimicking an infundibular cyst and review of the literature on ocular leishmaniasis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. e230–e232, 2010.

VERNAL, S. et al. Disseminated Leishmaniasis by *Leishmania viannia* Subgenus: A Series of 18 Cases in Southeastern Brazil. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. ofv184, 13, 2016.

VINK, M. M. T. et al. Evaluation of point-of-care tests for cutaneous leishmaniasis diagnosis in Kabul, Afghanistan. **EBioMedicine**, v. 37, p. 453–460, 2018.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. **Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010**, WHO technical report series ; 949. 2010.

WHO. Disponível em: <<https://www.who.int/pt>>. Acesso em: 15 set. 2021.

ZANETTI, A. D. S. et al. Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-*Leishmania* antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 61, p. e42, 2019.

## ANEXOS

## Anexo 1 – Parecer do Comitê de Ética

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



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira

**Pesquisador:** Gláucia Fernandes Cota

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 63259316.5.0000.5091

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

**Patrocinador Principal:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/ FIOCRUZ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.957.508

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto de pesquisa prospectivo, uma coorte transversal em um estudo maior (coorte). A população a ser estudada é composta de pacientes com suspeita de Leishmaniose Mucosa (LM) avaliados em centro de referência para tratamento da leishmaniose. Todos os indivíduos suspeitos de LM atendidos no CRL serão convidados a participar do estudo, o que significa terem seus dados clínicos e laboratoriais registrados, além de alíquotas de soro e fragmento de biópsia de tecido, congelados e armazenados. Tais espécimes biológicos são rotineiramente obtidos para a realização de exames diagnósticos na abordagem da doença, de modo que não se prevê qualquer procedimento exclusivamente em função do estudo. O estudo será conduzido no Ambulatório do CRL-CPqRR, que já realiza a avaliação clínica de casos suspeitos de leishmaniose de forma sistematizada através de ficha de atendimento estruturada previamente elaborada em formato de banco de dados e contendo todas as variáveis clínicas e epidemiológicas relevantes, além de todas as informações do tratamento (se realizado) e seguimento clínico.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo geral da pesquisa é descrever o desempenho dos testes diagnósticos (sorológicos,

**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-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

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



Continuação do Parecer: 1.957.508

imunológico e molecular), a eficácia terapêutica das alternativas disponíveis e a

evolução entre pacientes com (LM) em uma coorte prospectiva. os objetivos secundários são:

- 1- Descrever e comparar o desempenho dos testes sorológicos (RIFI, ELISA, imunocromatográfico), imunohistoquímico e moleculares para o diagnóstico de LM;
- 2-Descrever a taxa de cura clínica em 180 dias e recidiva em 1, 2 e 5 anos após terapia específica para LM;
- 3-Avaliar a taxa e a intensidade de eventos adversos clínicos e laboratoriais observados durante e após as várias terapias específicas para LM;
- 4-Identificar e caracterizar as espécies de Leishmania predominantes entre pacientes com a forma mucosa da doença em nosso meio, relacionandas à apresentação clínica da doença e resposta terapêutica observada.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A relação riscos/benefícios é positiva. Nenhuma intervenção em função exclusiva do estudo é prevista. A coleta de fragmento de lesão mucosa e amostra de sangue já fazem parte da rotina de investigação de casos suspeitos de LM. Estes procedimentos estão relacionados a risco de sangramento no local da coleta, de pequena monta e de controle com medidas locais. Em caso de alguma complicação, o serviço se compromete a prestar a assistência médica devida.

O risco de quebra do sigilo e confidencialidade das informações será minimizado pelo emprego de boas práticas em pesquisa, acesso aos prontuários e bancos de dados restrito aos pesquisadores cadastrados e manuseio de dados sem a identificação do indivíduo.

Não haverá benefícios diretos aos participantes, entretanto, a análise destes dados poderá contribuir na proposta de um algoritmo diagnóstico e recomendações terapêuticas para a doença com vistas na melhoria da assistência aos pacientes acometidos pela condição.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A proposta apresenta delineamento metodológico satisfatório e equipe capacitada para a execução. Além disto, o tema abordado é relevante para a saúde pública.

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

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

**Recomendações:**

NDA

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: 1.957.508

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

Todas as recomendações feitas em parecer anterior foram atendidas pelos pesquisadores. Portanto, esta relatoria decide pela aprovação da proposta.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após submissão e análise criteriosa 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 do projeto de pesquisa proposto. Firma-se diante deste documento a necessidade de serem apresentados os relatórios anuais 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_PROJETO_837656.pdf	23/02/2017 11:25:12		Aceito
Outros	cartarespostaCEP.pdf	23/02/2017 11:24:17	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_consentimentoPAIS.doc	23/02/2017 11:23:52	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_assentimento13a18.doc	23/02/2017 11:22:19	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_assentimento7a13.doc	23/02/2017 11:21:18	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_consentimentoMOD.doc	23/02/2017 11:20:45	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
Folha de Rosto	folhaRosto_assinada.pdf	22/12/2016 11:30:26	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoLMcoorte.pdf	20/12/2016 17:58:47	Gláucia Fernandes Cota	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-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

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



Continuação do Parecer: 1.957.508

Investigador	ProjetoLMcoorte.pdf	20/12/2016 17:58:47	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
Outros	FichaSeguimento.docx	19/12/2016 17:27:12	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
Outros	fichaEventoAdverso.docx	19/12/2016 16:46:13	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
Outros	FichaAvaliacaoInicial.docx	19/12/2016 16:44:43	Gláucia Fernandes Cota	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	anuencia_institucional.pdf	14/12/2016 07:46:56	Gláucia Fernandes Cota	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

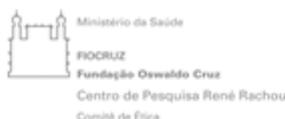
BELO HORIZONTE, 09 de Março de 2017

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-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

## ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa *Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira*. Uma coorte é um estudo que se propõe a acompanhar um conjunto de pessoas ao longo do tempo.

Você foi selecionado porque existe a suspeita de que os seus sintomas sejam decorrentes de leishmaniose mucosa, possibilidade que será investigada e se confirmada, precisará de tratamento e depois acompanhamento médico. Sua participação neste estudo não é obrigatória e mesmo se concordar em participar, a qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo para você, que poderá manter seu acompanhamento clínico neste ambulatório e realizar todos os exames necessários ao seu diagnóstico, dentro da capacidade do nosso serviço.

Os objetivos deste estudo são identificar os melhores exames que podem ajudar no diagnóstico de leishmaniose mucosa, além de compreender o efeito do tratamento ao longo do tempo. Sua participação nesta pesquisa consistirá em permitir que informações sobre sua doença, seus exames e sua resposta ao tratamento sejam registrados e analisados em conjunto com os dados de outros pacientes. Estas informações, retiradas de seu prontuário, serão mantidas arquivadas no Ambulatório do IRR sob a guarda dos pesquisadores. Além destas informações, uma amostra de sangue e uma parte do fragmento da lesão, que será colhido por biópsia para ajudar no seu diagnóstico, serão armazenados e depois analisados com alguns exames cuja utilidade estamos avaliando.

Trata-se de exames de sangue para pesquisar a presença de células de defesa contra *Leishmania* em seu sangue, exame parasitológico para a identificação da *Leishmania* e pesquisa do agente desta infecção no fragmento de tecido retirado por biópsia. Os riscos relacionados com sua participação são os mesmos que podem existir durante uma coleta de sangue e biópsia: sangramento local, manchas no local de realização do exame e dor durante o procedimento. Nossa equipe está treinada nestes procedimentos, que serão realizados com a técnica correta para reduzir ao máximo o risco destas complicações. Em caso de alguma complicação, você terá toda a assistência médica em nosso Ambulatório. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais. Apenas os pesquisadores cadastrados terão acesso ao seu prontuário e o sigilo em relação aos seus dados será sempre mantido, em nenhum momento seu nome ou qualquer dado que o identifique será revelado, seja durante a análise das informações ou durante a apresentação dos resultados desta pesquisa. Todas as medidas necessárias para prevenir a divulgação de sua identidade estão sendo tomadas, mas em caso de algum dano provocado pela sua participação neste estudo você terá direito a indenização.

O benefício da sua participação é contribuir para um maior entendimento da leishmaniose mucosa, o que pode melhorar a forma de diagnosticar e tratar a doença daqui para frente. Você receberá cópião original deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) desta instituição - IRR, órgão responsável pela defesa dos direitos de participantes em estudos científicos. Você pode tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento, com o pesquisador e com o CEP.

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome e assinatura do pesquisador principal

Gláucia Fernandes Cota - IRR/FIOCRUZ Minas – Coordenadora do Centro de Referência em Leishmaniose Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002) – Telefone 3349-7712- e-mail: cota@cpqrr.fiocruz.br

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - IRR/FIOCRUZ Minas - Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-009) - -Secretária: Bernadete Patrícia Santos – Telefax: (31) 3349 7825 e-mails: cepst-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do participante da pesquisa

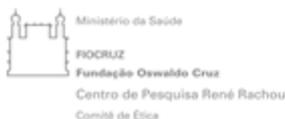
Nome por extenso: \_\_\_\_\_

Av. Augusto de Lima, 1715 Barro Preto, 30190-002, Belo Horizonte – MG - Brasil

Tel.: 55 0xx31 3349 7712 <http://www.cpqrr.fiocruz.br>

1 de 1

## ANEXO III – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

**Termo de Assentimento Livre e Esclarecido**

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira**.

Uma coorte é um estudo que se propõe a acompanhar um conjunto de pessoas ao longo do tempo. Seus pais ou seus representantes legais permitiram que você participe. Queremos saber quais os melhores exames que podem ajudar no diagnóstico de leishmaniose mucosa, além de compreender melhor o efeito do tratamento ao longo do tempo.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de idade de zero a 18 anos. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita no Ambulatório do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, onde as crianças são examinadas pelo médico e colhem sangue para exames. As informações das suas consultas e dos seus exames serão analisadas neste estudo. Este estudo não exigirá que você faça qualquer exame ou consulta diferente do que já está programado de acordo com a necessidade do seu caso. Por isto, esta pesquisa é considerada segura. Os riscos possíveis são os mesmos que podem ocorrer durante qualquer coleta de material para exame. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones da pesquisadora Dra Gláucia Cota (31 99984-3677). Mas há coisas boas que podem acontecer como a descoberta de informações úteis que podem melhorar o diagnóstico e o tratamento de outras pessoas com leishmaniose mucosa no futuro.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as pessoas que participaram da pesquisa.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa **Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira** que tem o objetivo de descobrir informações novas sobre a forma de diagnosticar e tratar a leishmaniose mucosa. Eu entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Assinatura do pesquisador principal**

Gláucia Fernandes Cota - ~~CPQRR~~ FIOCRUZ Minas – Coordenadora do Centro de Referência em Leishmaniose Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002) – Telefone 3349-7712 – e-mail: cota@cpqrr.fiocruz.br

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - ~~CPQRR~~ FIOCRUZ Minas - Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002) - Secretária: Bernadete Patrícia Santos - (31) 3349 7825 e-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome e assinatura do responsável legal pelo sujeito da pesquisa e relação parental:

## ANEXO IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 7 a 12 anos

**Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para crianças entre 7 e 12 anos**

Nome do participante: \_\_\_\_\_



Você está sendo convidado para participar de uma pesquisa, que é um estudo sobre uma doença que causa feridinhas dentro do nariz ou da boca. Seus pais ou as pessoas que tomam conta de você concordaram que você participe. Nós queremos saber quais os melhores exames que devem ser feitos para descobrir a causa das feridinhas em seu corpo. Também queremos entender melhor como os remédios funcionam nesta doença. As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de idade de zero a 18 anos. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita no Ambulatório do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, onde as crianças são examinadas pelo médico e colhem sangue para exames. As informações das suas consultas e dos seus exames serão analisadas neste estudo. Participando ou não deste estudo, as consultas e exames necessários serão os mesmos. Por isto, esta pesquisa é considerada segura. Os riscos possíveis são os mesmos que podem ocorrer durante qualquer coleta de material para exame. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones da pesquisadora Dra Gláucia Cota (31 99084-3877 ou 31 3349-7853). Mas há coisas boas que podem acontecer como a descoberta de informações úteis que podem melhorar o diagnóstico e o tratamento de outras pessoas com a mesma doença que você.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados desta pesquisa vão ser apresentados em revistas, mas sem identificar as pessoas que participaram da pesquisa.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa **Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira** que tem o objetivo de descobrir informações novas sobre a forma de diagnosticar e tratar a leishmaniose mucosa. Eu entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi cópião original deste documento e li e concordo em participar da pesquisa.

data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador principal

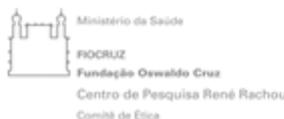
Gláucia Fernandes Cota - ~~CCO~~ FIOCRUZ Minas – Coordenadora do Centro de Referência em Leishmaniose Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002) – Telefone 3349-7712 – e-mail: cota@cpqr.fiocruz.br

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - ~~CCO~~ FIOCRUZ Minas - Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002) -- Secretária: Bernadete Patrícia Santos – (31) 3349.7825.e-mail: cepsh-opqr@cpqr.fiocruz.br

data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome e assinatura do participante da pesquisa

## ANEXO V – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 7 a 13 anos



## Termo de Assentimento Livre e Esclarecido para crianças entre 13 e 18 anos

Nome do participante: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira**.

Uma coorte é um estudo para acompanhar um conjunto de pessoas ao longo do tempo. Seus pais ou seus representantes legais permitiram que você participasse. Queremos saber quais os melhores exames que podem ajudar no diagnóstico de leishmaniose mucosa, além de compreender melhor o efeito do tratamento ao longo do tempo.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de idade de zero a 18 anos. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita no Ambulatório do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, onde as crianças são examinadas pelo médico e colhem sangue para exames. As informações das suas consultas e dos seus exames serão analisadas neste estudo. Este estudo não exigirá que você faça qualquer exame ou consulta diferente do que já está programado de acordo com a necessidade do seu caso. Por isto, esta pesquisa é considerada segura. Os riscos possíveis são os mesmos que podem ocorrer durante qualquer coleta de material para exame. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones da pesquisadora Dra Gláucia Cota (31 99984-3677 ou 31 3349-7853). Mas há coisas boas que podem acontecer como a descoberta de informações úteis que podem melhorar o diagnóstico e o tratamento de outras pessoas com leishmaniose mucosa no futuro.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as pessoas que participaram da pesquisa.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa **Leishmaniose mucosa: uma coorte brasileira** que tem o objetivo de descobrir informações novas sobre a forma de diagnosticar e tratar a leishmaniose mucosa. Eu entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi o original deste documento, li e concordo em participar da pesquisa.

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Assinatura do pesquisador principal

Gláucia Fernandes Cota - ~~CPQRR~~ FIOCRUZ Minas – Coordenadora do Centro de Referência em Leishmaniose Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002) – Telefone 3349-7712- e-mail: cota@cpqrr.fiocruz.br

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética - ~~CPQRR~~ FIOCRUZ Minas - Av. Augusto de Lima, 1715 – Barro Preto - Belo Horizonte (Cep: 30190-002) - Secretária: Bernadete Patrícia Santos – (31) 3349 7825 e-mail: cepsh-cpqr@cpqrr.fiocruz.br

\_\_\_\_\_ data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome e assinatura do participante da pesquisa

## ANEXO VI - Ficha de avaliação otorrinolaringológica



Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Data avaliação inicial \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Data início tratamento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

1. Face ( ) 0. Normal 1. Hiperemia 2. Infiltração 4. Pápulas 12. Úlcera 8. Não realizado exame			
Data	somatório das alterações	impressão evolutiva*	observação
D90 ____/____/____	( )	( )	
D180 ____/____/____	( )	( )	
D360 ____/____/____	( )	( )	

\*Impressão evolutiva: 0. Ausência de alteração 1. Melhora 2. Inalterado 3. Piorado 8. Não examinado 9. Não se aplica

2. Mucosa nasal ( ) 0. Normal 1. Enantema 2. Infiltração 4. Erosão/Ulceração 12. Perfuração septo 8. Não examinado			
Data	somatório das alterações	impressão evolutiva*	observação
D90 ____/____/____	( )	( )	
D180 ____/____/____	( )	( )	
D360 ____/____/____	( )	( )	

\*Impressão evolutiva: 0. Ausência de alteração 1. Melhora 2. Inalterado 3. Piorado 8. Não examinado 9. Não se aplica

3. Outra mucosa (descrever o local da alteração) _____ ( ) 0. Normal 1. Enantema 2. Infiltração 4. Erosão/Ulceração 8. Não examinado			
Data	somatório das alterações	impressão evolutiva*	observação
D90 ____/____/____	( )	( )	
D180 ____/____/____	( )	( )	
D360 ____/____/____	( )	( )	

\*Impressão evolutiva: 0. Ausência de alteração 1. Melhora 2. Inalterado 3. Piorado 8. Não examinado 9. Não se aplica

## Orientações para preenchimento:

1. A avaliação de baseline (antes do tratamento) deve ser registrada no retângulo destacado de cinza.
2. A primeira fase da avaliação consiste em informar o somatório que expresse as alterações identificadas.
3. Nas avaliações de acompanhamento, primeiro informar o somatório que expresse as alterações identificadas.
4. A seguir, informar a "impressão evolutiva" que reflete a comparação do somatório da avaliação atual com a de baseline.
5. Se o somatório for o mesmo, faça a avaliação da extensão do acometimento:
  - se área de lesão > 50% da situação baseline ou novo local com acometimento: considerar **piorado**
  - se área de lesão < 50% da extensão do baseline: considerar **melhorado**
  - mesma extensão: **inalterado**

*Observações devem ser registradas no verso*



Instituto  
René Rachou  
FIOCRUZ MINAS

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Data / /

Data / /

Data / /

Data / /

Data / /

## ANEXO VII – Ficha de Primeira Consulta



Nº prontuário
_____
Epi-Info
_____

LEISHMANIOSE TEGUMENTAR (LT)	
FICHA CLÍNICA DE ATENDIMENTO DE PRIMEIRA CONSULTA	
Data primeira consulta: ____/____/____	Encaminhado por (unidade / cidade):

1. Identificação do paciente (colar etiqueta ou preencher os campos)		
1.1. Nome preferencial do paciente (conforme identidade ou nome social)		
1.2. Nome da mãe:		
1.3. Data de nascimento: __/__/____ (copiar do documento de identidade)	1.4. Idade (anos completos):	1.5. Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino
1.6. Nº do cartão do SUS:	1.7. Nº da Carteira de Identidade ou Certidão:	
1.8. Endereço atual		
Rua: _____		
Nº e complemento: _____ Bairro: _____		
OU		
Povoado/Fazenda ou ponto de referência: _____		
1.9. CEP:	1.10. Município:	1.11. Estado:

2. Dados complementares	
2.1. Nome do paciente conforme identidade (caso paciente opte pelo nome social, informar aqui o nome completo de acordo com documento de identidade)	
2.2. Nome do responsável (se diferente da mãe):	
2.3. Raça /cor (autodeclarada) ( ) Branca ( ) Preta ( ) Parda ( ) Amarela ( ) Indígena ( ) Sem informação	
2.4. Escolaridade: Paciente é alfabetizado? ( ) Não ( ) Sim	2.5. Grau de instrução (caso alfabetizado), mesmo se incompleto: ( ) Fundamental I ( ) Fundamental II ( ) Ensino médio ( ) Ensino superior
2.6. Ocupação habitual (citar):	
2.7. Telefones de contato: Residencial: (____) _____ Trabalho: (____) _____ Celular: (____) _____	
2.8. Telefone de recado (número do telefone, nome do contato e tipo relação com o paciente – amigo, vizinho, mãe):	
2.9. Nome do centro de saúde mais perto de sua casa:	

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Epi-Info: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

<b>3. História da moléstia atual (HMA)</b>	
3.1. Queixa principal:	3.2. Data estimada de início dos sintomas: ____/____/____
3.3. Local provável da infecção (cidade/estado): _____ ( ) Indeterminado	
3.4. Já recebeu/aplicou algum tratamento para esta condição? ( ) Não ( ) Sim Se sim, qual? _____ Até quando? ____/____/____	
3.5. Descrição da HMA	

<b>4. História pessoal e pregressa</b>	
4.1. Possui condições associadas? ( ) Não ( ) Sim	
4.1.1. Se sim, quais?	
( ) HIV ( ) Hipertensão ( ) Doença cardíaca ( ) Doença renal ( ) Diabetes mellitus ( ) Doença hepática ( ) Doença reumatológica ( ) Transplantado ( ) Doença psiquiátrica ( ) Doença pulmonar ( ) Tabagismo ( ) Esquistossomose ( ) D. Chagas	
4.1.2. Descrever diagnóstico (quando apropriado): _____	
4.1.3. Descrever outras comorbidades associadas: _____	
4.2. Faz uso de bebida alcoólica? ( ) Não ( ) Sim	
4.2.1. Se sim, qual a quantidade e com qual frequência? _____	
4.3. É usuário de drogas ou outras dependências químicas? ( ) Não ( ) Sim	
4.3.1. Se sim, descrever: _____	
4.4. Faz uso constante de algum medicamento? ( ) Não ( ) Sim	
4.4.1. Se sim, quais?	
( ) quinidina ( ) <del>procainamida</del> ( ) amiodarona ( ) <del>propranolol</del> ( ) hidrato de cloral ( ) osetoconazol ( ) <del>disoniramide</del> ( ) <del>sotalol</del> ( ) antidepressivos tricíclicos ( ) <del>antracilinas</del> ( ) tetraciclina ( ) eritromicina ( ) <del>pentamidina</del> ( ) terfenadina ( ) sulfametoxazol + trimetoprima ( ) outros medicamentos. Qual(is)? _____	
4.5. Apresenta alergia a qualquer medicamento? ( ) Não ( ) Sim	
4.5.1. Se sim, qual (is)? _____	
4.6. Se mulher,	
4.6.1. É gestante? ( ) Não ( ) Sim Semanas de gestação: _____	
4.6.2. É lactante? ( ) Não ( ) Sim	
4.6.3. Faz uso de método anticoncepcional? ( ) Não ( ) Sim Qual? _____	
4.6.4. Data da última menstruação (se aplicável): ____/____/____	

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Epi-Info: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

(Continuação) História pessoal e progressa	
4.7. Informar exames e resultados já trazidos pelo paciente:	
4.8. Outras informações relevantes da história pessoal e progressa	

5. Exame físico	
5.1. Dados clínicos do paciente:	
5.1.1. Peso (kg): _____	5.1.2. Estatura (cm): _____
5.1.3. Pressão arterial (mmHg): _____ X _____	5.1.4. Pulso (por minuto): _____
5.2. Descrever exame físico:	
5.3. Sinais e sintomas	
5.3.1. Presença de lesão cutânea ativa? ( ) Não ( ) Sim Se sim, quantas? _____	5.3.2. Presença de lesão mucosa ativa? ( ) Não ( ) Sim ( ) lesão mucosa visualizada ( ) lesão mucosa suspeita Localização: _____
5.3.1.1 Presença de adenomegalias? ( ) Não ( ) Sim Descrever: _____ - Presença de linfangite? ( ) Não ( ) Sim - Presença de infecção bacteriana secundária? ( ) Não ( ) Sim	5.3.2.1. Marcar sintomas existentes e relatar outros: ( ) epistaxe ( ) odinofagia ( ) dor ( ) obstrução nasal ( ) disfagia ( ) hemoptoicos ( ) coriza ( ) dispneia ( ) tosse ( ) rouquidão/disfonia ( ) crosta nasal ( ) perda ponderal ( ) outros. Citar: _____
5.3.3. Presença de cicatriz na pele? ( ) Não ( ) Sim Se sim, descrever: _____	

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Epi-Info: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

<b>5.4. Caracterização de cada lesão CUTANEA (até 3 lesões)</b>	
<b>As lesões devem ser numeradas em ordem de tamanho, da maior para a menor</b>	
<b>LESÃO 1( ): _____</b>	
5.4.1. Qual a morfologia da lesão 1? <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Pápula (elevação circunscrita < 1 cm) <input type="checkbox"/> Nódulo (elevação circunscrita > 1 cm) <input type="checkbox"/> Placa (elevação de superfície plana > 1 cm) <input type="checkbox"/> Outra: _____	
5.4.2. Características da lesão 1: <input type="checkbox"/> bordas elevadas ou é elevada <input type="checkbox"/> fundo granuloso <input type="checkbox"/> crosta <input type="checkbox"/> eritematosa ou infiltrada	
5.4.3. Tamanho da lesão 1: _____ mm X _____ mm = _____ <b>Obs:</b> - úlcera: medir diâmetro interno <small>(Maior diâmetro)                      (maior diâmetro paralelo ao 1º)                      (Área da lesão)</small> - não úlcera: medir diâmetro total	
5.4.4. Localização lesão 1 <input type="checkbox"/> Cabeça: <input type="checkbox"/> face <input type="checkbox"/> couro cabeludo <input type="checkbox"/> orelha <input type="checkbox"/> região cervical <input type="checkbox"/> MMSS: <input type="checkbox"/> mãos <input type="checkbox"/> braço <input type="checkbox"/> antebraço    Lado: <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> direito <input type="checkbox"/> MMII: <input type="checkbox"/> pés <input type="checkbox"/> perna <input type="checkbox"/> coxa    Lado: <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> direito <input type="checkbox"/> tronco: <input type="checkbox"/> anterior <input type="checkbox"/> posterior	
<b>LESÃO 2( ): _____</b>	
5.4.5. Qual a morfologia da lesão 2? <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Pápula (elevação circunscrita < 1 cm) <input type="checkbox"/> Nódulo (elevação circunscrita > 1 cm) <input type="checkbox"/> Placa (elevação de superfície plana > 1 cm) <input type="checkbox"/> Outra: _____	
5.4.6. Características da lesão 2: <input type="checkbox"/> bordas elevadas ou é elevada <input type="checkbox"/> fundo granuloso <input type="checkbox"/> crosta <input type="checkbox"/> eritematosa ou infiltrada	
5.4.7. Tamanho da lesão 2: _____ mm X _____ mm = _____ <b>Obs:</b> - úlcera: medir diâmetro interno <small>(Maior diâmetro)                      (maior diâmetro paralelo ao 1º)                      (Área da lesão)</small> - não úlcera: medir diâmetro total	
5.4.8. Localização lesão 2 <input type="checkbox"/> Cabeça: <input type="checkbox"/> face <input type="checkbox"/> couro cabeludo <input type="checkbox"/> orelha <input type="checkbox"/> região cervical <input type="checkbox"/> MMSS: <input type="checkbox"/> mãos <input type="checkbox"/> braço <input type="checkbox"/> antebraço    Lado: <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> direito <input type="checkbox"/> MMII: <input type="checkbox"/> pés <input type="checkbox"/> perna <input type="checkbox"/> coxa    Lado: <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> direito <input type="checkbox"/> tronco: <input type="checkbox"/> anterior <input type="checkbox"/> posterior	
<b>LESÃO 3( ): _____</b>	
5.4.9. Qual a morfologia da lesão 3? <input type="checkbox"/> Úlcera <input type="checkbox"/> Pápula (elevação circunscrita < 1 cm) <input type="checkbox"/> Nódulo (elevação circunscrita > 1 cm) <input type="checkbox"/> Placa (elevação de superfície plana > 1 cm) <input type="checkbox"/> Outra: _____	
5.4.10. Características da lesão 3: <input type="checkbox"/> bordas elevadas ou é elevada <input type="checkbox"/> fundo granuloso <input type="checkbox"/> crosta <input type="checkbox"/> eritematosa ou infiltrada	
5.4.11. Tamanho da lesão 3: _____ mm X _____ mm = _____ <b>Obs:</b> - úlcera: medir diâmetro interno <small>(Maior diâmetro)                      (maior diâmetro paralelo ao 1º)                      (Área da lesão)</small> - não úlcera: medir diâmetro total	
5.4.12. Localização lesão 3 <input type="checkbox"/> Cabeça: <input type="checkbox"/> face <input type="checkbox"/> couro cabeludo <input type="checkbox"/> orelha <input type="checkbox"/> região cervical <input type="checkbox"/> MMSS: <input type="checkbox"/> mãos <input type="checkbox"/> braço <input type="checkbox"/> antebraço    Lado: <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> direito <input type="checkbox"/> MMII: <input type="checkbox"/> pés <input type="checkbox"/> perna <input type="checkbox"/> coxa    Lado: <input type="checkbox"/> esquerdo <input type="checkbox"/> direito <input type="checkbox"/> tronco: <input type="checkbox"/> anterior <input type="checkbox"/> posterior	

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Epi-Info: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

**6. Hipóteses diagnósticas**

6.1. Suspeita de Leishmaniose? ( ) Não ( ) Sim

6.1.1. Se sim, qual a forma clínica?

- ( ) Cutânea localizada ( ) Cutânea disseminada (> 6 lesões) ( ) Cutânea difusa  
 ( ) Cutânea e mucosa (simultaneamente) ( ) Mucosa exclusiva (leishmaniose mucosa tardia)

6.1.2. Outras hipóteses a considerar:

6.2. Tipo de entrada:

- ( ) caso novo (doença que se mantém ativa desde seu aparecimento, ainda que já tratada)  
 ( ) recidiva (doença que se mostra ativa após constatação de cura clínica)

**7. Investigação**

7.1. Procedimentos realizados para investigação

( ) **Biópsia / imprint**. Se biópsia, informar tipo de anestésico:

- SEM vasoconstritor  COM vasoconstritor  NA

( ) Aspirado

( ) Escarificado

( ) Swab

Espaço para etiquetas de material estéril para biópsia

7.2. Exames solicitados para diagnóstico:

( ) Parasitológico (pesquisa direta) ( ) Cultura para *Leishmania* ( ) PCR para *Leishmania*

Anatomopatológico (AP): ( ) Solicitado hoje

( ) Enviar posteriormente (ver protocolo) Data envio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Responsável: \_\_\_\_\_

Cultura fungos ( ) Solicitado hoje

( ) Enviar posteriormente (ver protocolo) Data envio: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Responsável: \_\_\_\_\_

Revisão AP de lâmina externa: ( ) Solicitado hoje

Data de recebimento da lâmina: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Responsável: \_\_\_\_\_

Data de envio para revisão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Responsável: \_\_\_\_\_

7.3. Exames complementares

( ) Sorologia para sífilis

( ) Anti HIV

( ) Sorologia para paracoccidiodiombose

( ) Hepatite B e C

( ) ~~CAHCA~~ e ~~CAHCA~~

( ) Outros\*

\*Descrever: \_\_\_\_\_

7.4. Exames gerais:

( ) Hemograma ( ) Eletrocardiograma (ECG) ( ) Outros\*.

( ) Exames bioquímicos (marcar abaixo):

- Transaminase oxalacética (TGO)  
 Transaminase pirúvica (TGP)  
 Gama glutamil transferase (GGT)  
 Fosfatase alcalina (FA)  
 Bilirrubina (BT / BD / BI)

- Amilase  
 Lipase  
 Ureia  
 Creatinina

- Sódio  
 Potássio  
 Magnésio

- Glicose  
 Proteínas totais  
 Albumina  
 β HCG

\*Descrever: \_\_\_\_\_

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Epi-Info: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

**8. Tratamento prescrito**

8.1. Antibacteriano ( ) Qual? \_\_\_\_\_  
 8.1.1. Descrever posologia (dose / tomada, tomadas / dia, via de administração), duração do tratamento, outras informações relevantes:

8.2. Terapia anti-leishmaniose ( ) Qual? \_\_\_\_\_  
 8.2.1. Descrever posologia (dose / tomada, tomadas / dia, via de administração), duração do tratamento, outras informações relevantes:

8.2.2. Se intralesional (IL), informar dados da aplicação ATUAL

Nº da aplicação	Volume de Glucantime	Tipo de anestésico			Observação
<input type="checkbox"/> IL	_____ mL	<input type="checkbox"/> SEM vasoconstritor	<input type="checkbox"/> COM vasoconstritor	<input type="checkbox"/> NA	

8.3. Outro ( ) Qual? \_\_\_\_\_  
 8.3.1. Descrever posologia (dose / tomada, tomadas / dia, via de administração), duração do tratamento, outras informações relevantes:

**9. Desfecho**

9.1. Desfecho: ( ) Retorno em (a data do retorno ou mês/ano) \_\_\_\_\_  
 ( ) Encaminhado ao serviço de origem  
 ( ) Encaminhado a outro serviço – citar especialidade: \_\_\_\_\_  
 ( ) Alta Ambulatorial

9.2. Outras condutas ou observações relevantes:

9.3. Assinatura e carimbo do médico

## ANEXO VIII – Ficha de Retorno

1. Identificação do paciente (colar etiqueta ou preencher os campos)					
1.1. Número de prontuário	1.2. Número de EPI INFO				
1.3. Data: ____/____/____					
1.4. Nome do paciente:	1.5. Idade				
2. Anotações clínicas					
3. Resultados de exames					
Data / /					
Exame	Resultado	Exame	Resultado	Exame	Resultado
3.1. Hemograma:		3.2. Bioquímicos:		TGO:	
Hg:		Glicose:		TGP:	
Leucócitos:		Ureia:		GGT:	
Plaquetas:		Creatinina:		Fosfatase alcalina (FA):	
		Amilase:		BT / BD (bilirrubina):	
		Lipase:		β HCG:	
3.3. ECG: Data: ____/____/____	3.3.1. Descrever:				
3.3.2. QTc: _____					
3.4. Outros:					
4. Exame físico					
4.1. Peso (kg): _____	4.2. Pressão arterial (mmHg): _____ X _____	4.3. Pulso: _____			
4.4. Observações da enfermagem:					
4.4. Tamanho da(s) lesão (ões) (mm): _____ x _____ x _____					
Obs: - úlcera; medir diâmetro interno		Lesão 1	Lesão 2	Lesão 3	
- não úlcera; medir diâmetro total					
4.4.1. Foi realizado registro fotográfico? ( ) Não ( ) Sim					
4.5. Houve mudança nas lesões e sintomas? ( ) Não ( ) Sim 5.5.1. Se sim, descrever (morfologia e tamanho, quando aplicável):					
4.6. Há sinais de atividade inflamatória (hiperemia, calor, infiltração) na lesão? ( ) Não ( ) Sim					
4.7. Há sinais de infecção secundária? ( ) Não ( ) Sim					
4.8. Exame físico geral					

Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Epi-Info: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

5. Tratamento em uso			
5.1. Medicamento: _____		5.2. Data de início: ____/____/____	
5.3. Posologia (dose/tomada, tomadas/dia, via de administração, duração prevista): _____			
5.4. Se intralésional (IL), informar dados da aplicação ATUAL:			
Nº da aplicação	Volume de Glucantime	Tipo de anestésico	
_____ * IL	_____ mL	<input type="checkbox"/> SEM vasoconstritor <input type="checkbox"/> COM vasoconstritor <input type="checkbox"/> NA	
6. Tratamentos prescritos nesta data			
6.1. Antibacteriano ( ) Qual? _____			
6.1.1. Descrever posologia (dose/tomada, tomadas/dia, via de administração, duração do tratamento, outras informações relevantes): _____			
6.2. Terapia anti leishmaniose ( ) Qual? _____			
6.2.1. Descrever posologia (dose/tomada, tomadas/dia, via de administração, duração do tratamento, outras informações relevantes): _____			
6.3. Outro _____			
6.3.1. Descrever posologia (dose/tomada, tomadas/dia, via de administração, duração do tratamento, outras informações relevantes): _____			
7. Verificação de Evento Adverso (EA)			
7.1. Há observação ou relato de evento adverso (EA)? ( ) Não ( ) Sim (registrar no item 2 data de início e fim e detalhes)			
7.1.2. Gravidade: ( ) Grave ( ) Não Grave			
7.1.3. Cite o(s) EA: _____			
8. Monitoramento (solicitação de exames)			
8.1. Foram solicitados exames? ( ) Não ( ) Sim			
Se sim, informar quais:			
( ) Hemograma	( ) Gama glutâmica transferase (GGT)	( ) Amilase	( ) Sódio
( ) Eletrocardiograma (ECG)	( ) Fosfatase alcalina (FA)	( ) Lipase	( ) Potássio
( ) Exames bioquímicos*	( ) Bilirrubina (BT / BD / BI)	( ) Ureia	( ) Magnésio
		( ) Creatinina	( ) Glicose
		( ) Proteínas totais	( ) $\beta$ HCG
		( ) Albumina	
( ) Outros: Citar: _____			
9. Avaliação de cura de LT			
9.1. Identifique o momento da avaliação:		9.2. Situação observada:	
( ) NA (não se trata de avaliação de cura ou de recidiva)		( ) cura: <input type="checkbox"/> <del>resolução</del> involução completa e AUSÊNCIA de infiltração /inflamação.	
( ) resposta inicial (entre 45-60 dias do início do tratamento)		<input type="checkbox"/> <del>resolução</del> involução completa e PRESENÇA de infiltração /inflamação.	
( ) cura inicial (60 dias do início do tratamento)		( ) Melhora: para LC $\rightarrow$ lesão reduziu no mínimo 50% do tamanho inicial.	
( ) cura definitiva (180 dias do início do tratamento)		Para LM $\rightarrow$ redução da intensidade da lesão (ver anexo B, CRL 154) ou 50% da extensão do comprometimento mucoso.	
( ) _____ meses após o tratamento		( ) Inalterada (em relação ao exame pré tratamento): inclui redução de lesão de extensão que não alcança 50%.	
		( ) piora: aumento de extensão da lesão, piora intensidade da lesão mucosa ou surgimento de lesão nova.	
		( ) recidiva: aparecimento de lesão ativa após ter alcançado cura.	
10. Desfecho			
10.1. ( ) Retorno em: _____		( ) Encaminhado ao serviço de origem	
( ) Encaminhado a outro serviço. Citar especialidade: _____		( ) Alta Ambulatorial	
10.2. Outras condutas ou observações relevantes: _____			
10.3. Assinatura e carimbo do médico			

## ANEXO IX – Ficha de Resumo de Caso

		RESUMO DO CASO		
<b>1. Identificação do paciente (colar etiqueta ou preencher os campos)</b>				
1.1. Número de prontuário	1.2. Número de EPI INFO	1.3. Folha de resumo nº:		
1.4. Nome do paciente:				
1.5. Paciente incluído em protocolo de pesquisa / estudo? ( ) Não ( ) Sim Se sim, indique qual e data de recrutamento: _____ ( / / ) _____ ( / / ) _____ ( / / ) _____ ( / / ) _____ ( / / )				
<b>2. Resultados diagnósticos</b>				
Para os seguintes exames, preencher com a opção adequada: 0. Negativo; 1. Positivo; 8. Não realizado; 9. Inconclusivo				
2.1. Imprint (pesquisa direta): ( ) Data: ____/____/____	2.5. PCR: ( ) Data: ____/____/____			
2.2. Cultura (aspirado de lesão): ( ) Data: ____/____/____	2.6. Aspirado de medula (Mielocultura): ( ) Data: ____/____/____			
2.3. Escarificado (pesquisa direta): ( ) Data: ____/____/____	2.7. Aspirado de medula (pesquisa direta): ( ) Data: ____/____/____			
2.4. Cultura fungos: ( ) Data: ____/____/____				
Para os exames a seguir, marcar a opção adequada ou preencher por extenso.				
2.8. Anátomo patológico (AP): ( ) diagnóstico (presença de <i>Leishmania</i> ) ( ) compatível (agente não visualizado)				
2.8.1. Data: ____/____/____ ( ) incompatível (quando confirmou outro dx) ( ) não realizado				
2.9. Sorologia (RIFI, DAT, Elisa, outros)				
Método: _____	Resultado: _____	Data: ____/____/____		
Método: _____	Resultado: _____	Data: ____/____/____		
Método: _____	Resultado: _____	Data: ____/____/____		
<b>3. Diagnóstico</b>				
3.1. Em caso de leishmaniose, qual a forma clínica? ( ) Tegumentar (LT) ( ) Visceral (LV)				
3.1.1. Outro diagnóstico: _____				
3.2. Em caso de LT, especificar: ( ) Cutânea localizada ( ) Cutânea disseminada (> 6 lesões) ( ) Cutânea difusa ( ) Cutânea e mucosa (simultaneamente) ( ) Mucosa exclusiva (leishmaniose mucosa tardia)				
3.3. Em caso de LT mucosa, informar:				
3.3.1. Localização das lesões: ( ) mucosa nasal ( ) faringe (palato mole, úvula, amígdala, hipofaringe) ( ) boca (lábio, língua, palato duro) ( ) laringe / glote ( ) Outro: _____				
3.3.2. Classificação LM (Cuentas-Llanos, 1997): ( ) Nasal exclusivo ( ) mucosa oral/faríngea/laríngea, sintomas leves ( ) mucosa oral/faríngea/laríngea, sintomas intensos				
<b>4. Histórico de Tratamento da leishmaniose</b> * se intralesional (IL), informar detalhes no item 5				
Medicamento	Posologia* (dose / intervalo)	Via de administração*	Data de início	Data de término

