



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Ageu Quintanilha Viana Nascimento

Avaliação do Elisa *in house* em apoio ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz

Rio de Janeiro

2023

Ageu Quintanilha Viana Nascimento

Avaliação do Elisa *in house* em apoio ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda Nunes Santos.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Eliame Mouta Confort.

Rio de Janeiro

2023

Título do trabalho em inglês: Assessment of in-house ELISA for supporting the diagnosis of patients with American Tegumentary Leishmaniasis treated from 2000 to 2005 at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Fiocruz.

N244a Nascimento, Ageu Quintanilha Viana.
Avaliação do Elisa *in house* em apoio ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz / Ageu Quintanilha Viana Nascimento. -- 2023.
82 f. : il.color.

Orientadora: Fernanda Nunes Santos.
Coorientadora: Eliame Mouta Confort.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública e Meio Ambiente) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2023.
Bibliografia: f. 61-65.

1. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática. 2. Leishmaniose Cutânea - diagnóstico. 3. Leishmaniose Cutânea - epidemiologia. 4. Leishmaniose Cutânea - transmissão. 5. Registros Médicos. I. Título.

CDD 616.9364

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: Cláudia Menezes Freitas - CRB-7-5348
Biblioteca de Saúde Pública

Ageu Quintanilha Viana Nascimento

Avaliação do Elisa *in house* em apoio ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Gestão e Saneamento Ambiental.

Aprovada em: 27 de setembro de 2023.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Flávia Coelho Ribeiro
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio

Prof. Dr. Jaime Antonio Abrantes
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra. Eliame Mouta Confort (Coorientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof.^a Dra. Fernanda Nunes Santos (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Rio de Janeiro

2023

Dedico aos meus filhos e à minha esposa, minha motivação diária para construir um mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e inspiração para vivenciar essa experiência.

Agradeço aos meus pais pela educação ofertada ao longo da vida e por acreditarem no meu potencial de ir mais além. Vocês me inspiram!

Ao meu irmão, minhas irmãs, sobrinhos e sobrinhas! Vocês são meu porto seguro!

Agradeço a toda minha família por compreenderem minha ausência e fazerem dos momentos juntos uma eternidade a ser vivida.

À minha esposa, Suely, por toda paciência, carinho, força e apoio nos momentos mais difíceis e por dividir comigo o sofrimento, os aprendizados e desafios vivenciados ao longo da trajetória e me acolher da melhor forma possível! Você foi uma esposa incrível!

Aos meus filhos, Arthur José e Laura Maria (minha princesa que chegou no meio do mestrado), que me inspiram e não me deixam parar!

A todos os meus amigos e amigas que de alguma forma me inspiraram a dar mais um passo adiante na vida acadêmica.

Ao Sistema Único de Saúde (SUS), patrimônio do povo brasileiro e emblema da bandeira que defendo. Cada profissional que compõe esse sistema e cada luta vivida me fez chegar até aqui!

A Lillian Oliveira e Bruna Barbosa que ofertaram suporte emocional e técnico na reta final e contribuíram para este trabalho!

À minha coorientadora, Dra. Eliame Confort, que contribuiu significativamente para que esse estudo fosse realizado.

À minha orientadora que com carinho e dedicação me acompanhou nesse projeto. Mais que uma orientadora, Dra. Fernanda Nunes, tornou-se uma grande tutora e parceira. Dra. Fernanda Nunes você é um grande presente que a vida me deu. A forma respeitosa e empática com que conduziu toda nossa relação, 100% remota, foi um grande exemplo e inspiração para mim. Muito obrigado!

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença de amplo espectro clínico e os sinais clínicos não são patognomônicos da doença. O diagnóstico se faz através da observação do parasito em material de lesão, entretanto, métodos com maior simplicidade em sua realização laboratorial, na obtenção de amostras e transporte são necessários. O ELISA é um método de importância para o diagnóstico do LTA e o seu uso em grande escala necessitam de pesquisas que possam avaliar seu desempenho. Este estudo teve por objetivo realizar uma avaliação retrospectiva do desempenho do ELISA *in house* em apoio ao diagnóstico da LTA nos pacientes atendidos no período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fiocruz-RJ. Foi realizado um estudo transversal retrospectivo em que foram analisadas informações clínicas dos pacientes com LTA, resultados do ELISA *in house* e resultados parasitológicos (do cultivo *in vitro* do parasito, do exame direto/*imprint* e da histopatologia) provenientes de bancos de dados e/ou prontuários médicos. O ELISA *in house* apresentou uma maior positividade 85,4% nos pacientes com LTA quando comparado ao cultivo *in vitro* (59,2%) e ao exame direto/*imprint* (44,2%). Entretanto, foi observada uma menor positividade quando se comparou a histopatologia (87,4%) e ao parasitológico geral (94%). Demonstrou uma concordância de 56% com cultivo *in vitro*, 52% com exame direto/*imprint*, 77% com a histopatologia e 82% com algum dos exames parasitológicos positivos. Entretanto, mesmo diante de alguns valores altos, não foi possível estabelecer significância entre essas correspondências (Kappa Cohen's $p > 0,05$). Não foi possível diferenciar as formas clínicas de LTA estudadas utilizando ELISA *in house* (Kruskal-wallis, $p > 0,05$), entretanto, foi observado um leve aumento das medidas de unidade arbitrária (UA) e densidade ótica (DO) do ELISA *in house* em pacientes com a forma mucosa da doença. Não foi possível diferenciar os pacientes com de lesões cutâneas e lesões associadas ao quadro de LTA dos pacientes sem presença de lesões cutâneas (com lesões mucosas) e sem lesões associadas. Os resultados encontrados demonstram que a utilização do ELISA *in house* tem potencial de apoio no diagnóstico de pacientes com LTA, sendo importante destacar que mais estudos são necessários para evidenciar o real valor diagnóstico do ELISA *in house* na identificação da LTA.

Palavras-chave: ELISA; diagnóstico; Leishmaniose Tegumentar Americana.

ABSTRACT

The American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a disease with a broad clinical spectrum, and clinical signs are not pathognomonic of the disease. Diagnosis is made through observing the parasite in lesion material; however, methods with greater simplicity in laboratory execution, sample collection, and transport are necessary. ELISA is an important method for ATL diagnosis, and its large-scale use requires research to evaluate its performance. This study aimed to conduct a retrospective evaluation of the performance of in-house ELISA in support of the diagnosis of ATL in patients treated from 2000 to 2005 at the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI)/Fiocruz-RJ. A retrospective cross-sectional study was conducted analyzing clinical information of patients with ATL, in-house ELISA results, and parasitological results (from in vitro parasite culture, direct/imprint examination, and histopathology) from databases and/or medical records. In-house ELISA showed higher positivity (85.4%) in patients with ATL compared to in vitro culture (59.2%) and direct/imprint examination (44.2%). However, lower positivity was observed compared to histopathology (87.4%) and overall parasitological (94%). It demonstrated a 56% agreement with in vitro culture, 52% with direct/imprint examination, 77% with histopathology, and 82% with any positive parasitological tests. However, even with some high values, it was not possible to establish significance between these correspondences (Cohen's Kappa $p > 0.05$). It was not possible to differentiate the clinical forms of ATL studied using in-house ELISA (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$); however, a slight increase in arbitrary unit (AU) measures and optical density (OD) of in-house ELISA was observed in patients with the mucosal form of the disease. It was not possible to differentiate patients with cutaneous lesions and lesions associated with ATL from patients without cutaneous lesions (with mucosal lesions) and without associated lesions. The results demonstrate that the use of in-house ELISA has the potential to support the diagnosis of patients with ATL. It is important to highlight that further studies are necessary to demonstrate the real diagnostic value of in-house ELISA in identifying ATL.

Keywords: ELISA; diagnosis; American Tegumentary Leishmaniasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp	18
Figura 2 -	Ciclo biológico da <i>Leishmaniose</i> Tegumentar Americana.....	21
Figura 3 -	Estado de endemidade da <i>Leishmaniose</i> cutânea no mundo, 2020	22
Figura 4 -	População do estudo.....	40
Figura 5A -	Distribuição dos valores de densidade óptica das formas clínicas avaliadas.....	52
Figura 5B -	Distribuição das medidas de unidade arbitrária das formas clínicas avaliadas.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos confirmados e notificados de LTA no Estado do Rio de Janeiro entre 2010 a 2020	25
Tabela 2 - Distribuição por ano durante o período de estudo (2000 a 2005) do número de pacientes com LTA atendidos, ensaios de ELISA <i>in house</i> , isolamento <i>in vitro</i> , exame direto/ <i>imprint</i> e histopatológico realizados de 2000 a 2005	48
Tabela 3 - Apresentação dos resultados percentuais dos diferentes ensaios diagnósticos realizados no período de 2000 a 2005 em pacientes com LTA..	49
Tabela 4 - Pacientes com resultados de ELISA <i>in house</i> positivos (reagentes) e a relação com os resultados nos testes parasitológicos	50
Tabela 5 - Pacientes com resultados de ELISA <i>in house</i> negativos (não reagentes) e a relação com os resultados nos testes parasitológicos	51
Tabela 6 - Concordância do ELISA <i>in house</i> com os testes diagnósticos para LTA (cultivo <i>in vitro</i>), exame direto/ <i>imprint</i> , histopatologia e parasitológico geral	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ES	Espírito Santo
GM	Gabinete Ministerial
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IC	Intervalo de Confiança
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IPEC	Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LIT	<i>Live Infusion Triptose</i>
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MG	Minas Gerais
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural Killer</i>
NNN	Neal Novy e Nicolle
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan Americana de Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Direta
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
RJ	Rio de Janeiro
SIPEC	Sistema de Prontuário Eletrônico do Paciente
SP	São Paulo
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
WHO	<i>World Organization Health</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	BREVE HISTÓRIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	16
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR	17
2.3	TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO	20
2.4	EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	21
2.5	CONTROLE DA DOENÇA	25
2.6	APRESENTAÇÃO CLÍNICA E TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	26
2.6.1	Apresentação clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana	26
2.7	DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	28
2.7.1	Resposta imune da LEISHMANIOSE Tegumentar Americana	28
2.7.2	Diagnóstico clínico	29
2.7.3	Diagnóstico parasitológico	29
2.7.4	Diagnóstico molecular	31
2.7.5	Diagnóstico imunológico	32
2.7.6	Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana	33
3	JUSTIFICATIVA	36
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	METODOLOGIA	40
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	40
5.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO	40
5.3	MONTAGEM DO BANCO DE AMOSTRAS E COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICAS DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	41
5.3.1	Crériterios de elegibilidade para a população de estudo	42
5.4	ANÁLISES REALIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ELISA <i>IN HOUSE</i> COM ANTÍGENO DE <i>L. (V.) BRASILIENSIS</i> EM APOIO AO DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	

	AMERICANA	42
5.4.1	Descrição da população de estudo e do perfil dos resultados dos testes parasitológicos e do ELISA <i>in house</i> com antígeno <i>L. (V.) Brasiliensis</i>.....	42
5.4.2	Concordância entre o ELISA <i>in house</i> com antígeno <i>L. (V.) Brasiliensis</i> com o cultivo <i>in vitro</i>, a histopatologia e o exame direto/<i>imprint</i>	42
5.4.3	Descrição das respostas sorológicas do ELISA <i>in house</i> com antígeno <i>L. (V.) Brasiliensis</i> dos pacientes com LTA nas diferentes formas clínicas da doença....	43
5.4.4	Descrição das características clínicas das lesões de pacientes com LTA frente a resposta sorológica do ELISA <i>in house</i> com antígeno <i>L. (V.) Brasiliensis</i>.....	43
5.5	PROTOCOLO DE ATENDIMENTO E DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE LTA ATENDIDOS NO LAPCLINVIGILEISH NO PERÍODO DE 2000 A 2005	43
5.6	ASPECTOS ÉTICOS	45
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6	RESULTADOS	47
6.1	DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO E DOS TESTES UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA REALIZADOS NO PERÍODO DE ESTUDO	47
6.2	DESCRIÇÃO DAS RESPOSTAS SOROLÓGICAS NO ELISA <i>IN HOUSE</i> COM ANTÍGENO <i>L. (V.) BRASILIENSIS</i> DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM SUAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DURANTE O PERÍODO DE ESTUDO	51
6.3	DESCRIÇÃO DAS RESPOSTAS SOROLÓGICAS NO ELISA <i>IN HOUSE</i> COM ANTÍGENO <i>L. (V.) BRASILIENSIS</i> DOS PACIENTES COM PRESENÇA DE LESÕES CUTÂNEAS E LESÕES ASSOCIADAS DOS PACIENTES COM LTA DURANTE O PERÍODO DE ESTUDO	53
6.4	AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA DO ELISA <i>IN HOUSE</i> COM ANTÍGENO DE <i>L. (V.) BRASILIENSIS</i> COM OS TESTES PARASITOLÓGICOS REALIZADOS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO PERÍODO DE ESTUDO	54
7	DISCUSSÃO	55
8	CONCLUSÃO	59

REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A – SOLICITAÇÃO DE ISENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	66
APÊNDICE B – TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS (TCUD).....	68
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	69
ANEXO B – PARECER ELABORADO PELA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE.....	78

1 INTRODUÇÃO

A história das leishmanioses passa pela expansão colonial europeia nos continentes asiático e africano (Benchimol; Jogas, 2020). As primeiras pesquisas, datam do ano de 1886, acreditavam que os sintomas não se tratava de uma nova doença, mas sim variações dos casos de malária. Os trabalhos liderados por Willian Boog Leishman e Max Luhe, entre os anos 1800 a 1900, contribuíram significativamente para o conhecimento e definição do agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (Conceição, 2014; Jogas, 2019; Benchimol, 2020).

No continente americano acredita-se que as *leishmanioses* cutâneas remontam a 120 milhões de anos. O registro em peças de cerâmica no Peru, Equador e Colômbia datam de 400 a 900 anos d.C. e mostram rostos mutilados na região nasal com forte semelhança com os danos causados pela forma mucosa da doença. A história da leishmaniose, tanto no Velho quanto no Novo Mundo, passa pelo reconhecimento da doença, a busca por sua etiologia, intervenção clínica, a identificação do transmissor, sua origem e evolução (OPAS, 2021).

O agente etiológico da LTA é um protozoário do Filo *Protozoa*, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*, é um parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear. No continente Americano têm-se a circulação confirmada de doze espécies de *Leishmania*. No Brasil identificou-se sete espécies: seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (BRASIL, 2017). A LTA tem como vetor os flebotomíneos da espécie *Lu. intermedia* (Gontijo, 2003).

Os hospedeiros são considerados aquelas espécies de animais que garantem a circulação do parasito em um dado território geográfico em um espaço de tempo. Têm-se como hospedeiros identificados os animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (BRASIL, 2017). A transmissão da doença ocorre no ato do repasto sanguíneo de insetos flebotomíneos infectados. O padrão epidemiológico da doença divide-se basicamente em: silvestre, ocupacional, lazer, rural e/ou periurbano em áreas de colonização (BRASIL, 2017).

O ciclo da doença envolve a transferência dos parasitos digenéticos na forma promastigota do vetor para o hospedeiro. Na forma promastigota o parasito apresenta-se de forma alongada com flagelo externo no tubo digestório do inseto vetor. A forma amastigota está presente em células do sistema fagocítico mononuclear dos vertebrados (Gontijo, 2003). As diversas espécies de *Leishmania* e a forma como será elaborada a resposta imune do hospedeiro são fatores que determinarão o quadro clínico e as manifestações clínicas da doença (Gontijo, 2003; OPAS, 2021).

A LTA é considerada como um problema de saúde pública de alta frequência nas Américas e destaca-se entre as seis doenças infecto parasitárias de maior importância no continente (BRASIL, 2007). Segundo o Informe Epidemiológico das Américas da OPAS de 2019, entre 2001 e 2019, foram notificados 1.028.054 (um milhão vinte e oito mil e cinquenta e quatro) casos de leishmaniose cutânea e mucosa por dezessete países endêmicos das Américas (OPAS, 2021).

A LTA tem duas principais classificações clínicas: Leishmaniose Cutânea e a Leishmaniose Mucosa (BRASIL, 2017). Na Leishmaniose Cutânea observa-se as seguintes formas: forma cutânea localizada única ou múltipla. Sendo que a primeira se caracteriza por lesões únicas (típicas) ou múltipla, já a segunda apresenta-se na forma cutânea disseminada, com lesões múltiplas (mais de 10) acometendo várias partes do corpo. A forma recidiva cutis ocorre quando há a reativação de lesão cicatrizada previamente e a forma cutâneo difusa caracteriza-se por lesões infiltradas atingindo grandes extensões (BRASIL, 2017; OPAS 2021).

A confirmação da LTA envolve o diagnóstico clínico epidemiológico do paciente e o diagnóstico laboratorial. O diagnóstico laboratorial envolve basicamente 3 grandes grupos de análises: as técnicas parasitológicas, as técnicas imunológicas e as técnicas histopatológicas conforme Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). Algumas Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde e Hospitais Universitários adotam também as técnicas moleculares. A técnica parasitológica se dá com a demonstração direta do parasito, as técnicas imunológicas (Intradermoreação de Montenegro (IDRM), RIFI e ELISA) avaliam a presença de anticorpos anti-*Leishmania* e a resposta celular frente ao extrato lisado do parasito. As técnicas moleculares avaliam a presença de DNA do parasito nas amostras pesquisadas (OPAS, 2021).

Os ensaios imunoenzimáticos são testes que permitem a realização de ensaios qualitativos e quantitativos com objetivo de detectar antígenos ou anticorpos (CONFORT, 2009). O ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para LTA é um teste imunoenzimático de múltiplas fases que quantifica anticorpos, possui elevada precisão para a detecção de quantidades mínimas de anticorpos. O ELISA apresenta maior positividade na LTA quando realizado na fase inicial da doença na forma cutânea e nos casos graves (Ferreira; Moraes, 2013).

O ELISA pode também ser utilizado para a avaliação do controle da cura, associando-se a negatificação dos títulos com a cicatrização das lesões e ao bom prognóstico (Medeiros *et al.*, 2017). Possui potencial para: diagnosticar a LTA quando os pacientes apresentam alta

suspeição clínica e apresentam exame parasitológico negativo. Dessa forma ele pode atuar como fator esclarecedor para diagnóstico diferenciado em relação a outras doenças e no controle da cura ou processo de recidiva da doença (CONFORT, 2009).

No território nacional, o ELISA têm sido objeto de estudo no intuito de buscar avaliar seu desempenho para o diagnóstico da LTA (Zanetti *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2019). Destaca-se por ser um teste realizado de forma automática, em larga escala e de fácil reprodutibilidade e com facilidade de implementação em centros diagnósticos públicos. Diante do exposto, esse trabalho busca avaliar o desempenho do ELISA *in house* no imunodiagnóstico da leishmaniose tegumentar americana em pacientes atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas na Fiocruz no período de 2000 a 2005.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BREVE HISTÓRIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A história das leishmanioses passa pela expansão colonial europeia. Com as expedições para Ásia e ao Norte da África surgiram os primeiros sinais de úlceras na pele com comprometimento de região mucosa em humanos. A doença recebia nomes conforme sua localização geográfica de ocorrência como: Botão de Aleppo (referência à Síria), Botão de Biskra (Argélia). Na região de Assam (Índia), a doença era denominada de *kala-azar* (termo de origem local em referência ao escurecimento que a doença causava na pele). No período entre 1891 a 1901 a Leishmaniose deixou algumas regiões da Índia despovoadas, chegando a ceifar cerca de 30% da população local (Benchimol; Jogas, 2020).

Novas pesquisas acreditavam que os sintomas não se tratavam de uma nova doença, mas sim de variações dos casos de malária (Benchimol, 2020). Em 1903, Ross denomina um novo protozoário, batizando-o de *Leishmania* em homenagem ao precursor dessa descoberta. Em 1906, o agente passa a ser cunhado como *Leishmania tropica* por Max Luhe (Jogas, 2019). No século XX as Leishmanioses tornar-se-ão uma das doenças mais instigantes e pesquisadas. Fato esse ratificado nos registros de bordo das expedições realizadas por Evandro Chagas a Amazônia (Vale; Furtado, 2005).

Com o avanço das pesquisas das Leishmanioses denominou-se a *Leishmania donavoni* como agente etiológico da forma visceral da doença e a *Leishmania tropica* como agente etiológico da forma dermatológica. As primeiras publicações sobre a *Leishmaniose* no Século XX ainda distinguiam o *kala-azar* do “Botão do Oriente” (Benchimol; Jogas, 2020).

No continente americano acredita-se que as *leishmanioses* cutâneas remontam a milhões de anos. O registro em peças de cerâmica no Peru, Equador e Colômbia datam de 400 a 900 anos d.C. e mostram rostos mutilados na região nasal com forte semelhança com os danos causados pela forma mucosa da doença. (OPAS, 2021). No ano de 1909 teve-se a primeira publicação de leishmaniose cutânea no continente americano (Jogas, 2019).

Com os avanços econômicos no país surge a construção da Estrada de Ferro. Esta ligaria o estado do Mato Grosso ao Porto de Santos em São Paulo. O aumento acentuado de trabalhadores doentes, na construção da ferrovia, levou Adolpho Lutz (Instituto de Bacteriologia de São Paulo) a classificar a doença, denominada de “úlceras de Bauru”, como a quarta doença mais importante do estado naquele momento (Jogas, 2019).

Despontou no cenário de pesquisa o jovem Gaspar Vianna, médico paraense, que após longos estudos propôs que havia a ocorrência de uma nova espécie no Brasil: a *Leishmania (Viannia) braziliensis* (OPAS, 2021). A partida repentina de Gaspar Vianna, aos 29 anos, deixou uma lacuna em aberto sobre a possibilidade da *Leishmania braziliensis* ser a responsável pela forma mucosa da doença.

Em publicações futuras, Patrick Manson viria reforçar as teorias de Vianna. Em 1916 o médico Alfredo da Matta propôs uma divisão das manifestações clínicas das leishmanioses em relação ao agente etiológico. Sendo a forma visceral causada pela *Leishmania donovani* e a forma tegumentar (cutânea, mucosa e cutâneamucosa) causada por espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania furunculosa*. (Jogas, 2019).

Alguns marcos importantes nesse período contribuíram para o avanço e fortalecimento das pesquisas e João Baptista Montenegro estudou e propôs o diagnóstico a partir da intradermoreação. Sendo que a última revolucionou o diagnóstico da doença e tornar-se-ia o padrão ouro por muitos anos no Brasil (Jogas, 2019).

Todo o trabalho de Samuel Pessoa contribuiu para a confirmação daquilo que fora proposto por Gaspar Vianna, a confirmação de uma espécie diferente daquela do “Botão do Oriente” como responsável pelos casos no Brasil: a *Leishmania braziliensis*. Essa persiste como a única responsável pelos casos da forma cutânea e muco-cutânea no Brasil até 1960. Nesse mesmo ano, o próprio Samuel Pessoa reconhece novas cinco espécies: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana* e *L. pifanoi* (Jogas, 2019).

No período que abrange de 1963 a 1970 observa-se evolução no estudo sobre a forma como as *Leishmanias* se desenvolviam no intestino dos flebotomíneos. Em 1987, têm-se o entendimento de dois grupos filogenéticos diferentes: *Viannia*, presente nas Américas, e *Leishmania* presente no Velho e Novo Mundo. Com um amplo quadro sintomático e uma etiologia complexa, a doença permanece na lista das Doenças Tropicais Negligenciadas da OPAS e como um desafio a ser enfrentado nas Américas (OPAS, 2021).

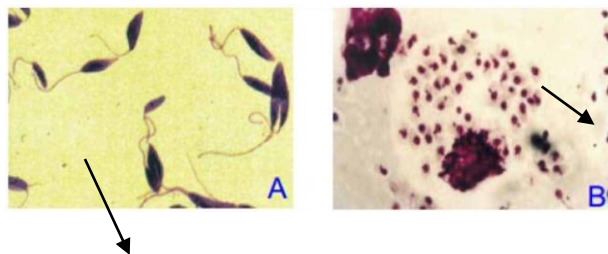
2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E VETOR

O agente etiológico da LTA é um protozoário do Filo *Protozoa*, da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*, um parasito intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear. Os parasitos da Família *Trypanosomatidae* caracterizam-se por apresentar uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida.

Apresentam-se de duas formas: flagelada ou promastigota ou na forma amastigota com flagelo não aparente (Figura 1) (Pessoa; Martins, 1982).

A forma promastigota é encontrada geralmente no tubo digestivo do inseto vetor, invertebrado. Já a forma amastigota é identificada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. Os promastigotas têm como características: corpo alongado, tamanho aproximado de 14 e 20 μ m e flagelo livre. Os amastigotas apresentam corpo ovoide e medem entre 2,1 e 3,2 μ m e flagelo interno (Pessoa; Martins, 1982).

Figura 1 - Formas evolutivas de *Leishmania* spp. A: promastigota B: amastigota



Fonte: Brasil, 2017.

No continente Americano têm-se a circulação confirmada de doze espécies de *Leishmania* como agente etiológico da doença em humanos e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil identificou-se sete espécies: seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (BRASIL, 2017). Há diversos métodos para a identificação das várias espécies de *Leishmania*, entretanto, a eletroforese de isoenzimas permanece como o melhor método (Cupolillo *et al*, 1994; Vale; Furtado, 2005). A infecção em humanos pode ser assintomática ou apresentar um quadro clínico com muitas manifestações inespecíficas, caracterizando-se em seu quadro clássico por gerar lesões em pele e mucosas (OPAS, 2021).

As espécies circulantes no país pertencem ao subgênero *Viannia* e *Leishmania*. A espécie *L. (V) braziliensis* é presente nos vinte e sete estados da federação, seguida da espécie *L. (L) amazonensis* presente em dezesseis estados. As outras cinco espécies, *L. (V) guyanensis*, *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi*, *L. (V) lindenberg* e *L. (V) shawi* foram identificadas como circulantes nos estados da região Norte e Nordeste (BRASIL, 2017). Na região sudeste prevalece a circulação das espécies *L. (V) braziliensis* (Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP)), *L. (L) forattiwunii* (ES), *L. (L) amazonensis* (MG) e *L. (L) enriettii* (SP) (BRASIL, 2017).

As espécies têm apresentado evolução quanto ao seu *habitat*, aquelas que antes tinham características silvestres, já podem ser identificadas em ambientes periurbanos ou em áreas de colonização humana. A plasticidade de algumas espécies tem suscitado questionamentos sobre a presença destas em áreas de transmissão, antes incomum ou com pouca frequência. Essa mudança na dinâmica do ciclo de transmissão demonstra que a distribuição geográfica observada revela uma forte adaptação dos vetores e hospedeiros do que necessariamente uma mudança no bioma (OPAS, 2021).

A LTA tem como vetor os flebotomíneos. Esses insetos, pertencentes à ordem *Díptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, gênero *Lutzomyia* (*Lu.*), são também conhecidos popularmente como mosquito-palha, tatuquira, birigui. As espécies mais comuns no ciclo de transmissão no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia* e *Lu. migonei*. As espécies *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* são consideradas como as principais espécies envolvidas na transmissão da *L. (V) braziliensis* pois apresentam um alto grau de antropofilia (Lima, 2010).

Os hospedeiros são considerados aquelas espécies de animais que garantem a circulação do parasito em um dado território geográfico em um espaço de tempo. Têm-se como hospedeiros identificados os animais silvestres, sinantrópicos e domésticos ((BRASIL, 2017). Segundo a OPAS, 2021 os mamíferos silvestres de sete ordens são considerados os principais hospedeiros das principais espécies de *Leishmania* spp. dentre as espécies destacam-se os animais das ordens: *Didelphimorphia* (gambá), *Cingulata* (tatu), *Pilosa* (tamanduá e preguiça), *Rodentia* (roedores), *Primata*, *Carnivora* (cães domésticos/selvagens e gatos) e *Chiroptera* (morcego) como hospedeiros das espécies *L. infantum*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. naiffi*, *L. mexicana* e *L. shawi*.

Os cães, da ordem *Carnivoros*, ainda permanecem como um ponto controverso a serem elucidado, já que não se sabe se o cão é um hospedeiro natural ou acidental da *Leishmania* (OPAS, 2021). Na LTA o cão apresenta poucas formas parasitárias disponíveis para o vetor (restritas as áreas de lesão, com pouca quantidade de parasitos disponíveis para infecção do vetor) (Madeira,2003). Não tendo a importância epidemiológica que possui na leishmaniose visceral, em que é considerado reservatório da doença (BRASIL, 2017). A variedade de hospedeiros, seus modos de vida e habitat tornam a epidemiologia da LTA complexa. Compreender os elos da cadeia de relacionamento e interdependência entre esses hospedeiros é um ponto de partida para a compreensão da ecologia das espécies no território (BRASIL, 2017).

2.3 TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

A transmissão da doença ocorre no ato do repasto sanguíneo de insetos flebotomíneos infectados, não é transmissível de pessoa a pessoa. O padrão epidemiológico da doença divide-se basicamente em: silvestre (hospedeiro vertebrado circulando no ambiente do vetor), ocupacional e lazer (o vetor circula em ambientes ocupacionais ou de lazer de hospedeiros vertebrados) e rural e/ou periurbano em áreas de colonização (o hospedeiro vertebrado circula pelo ambiente do vetor a partir de exploração da natureza para fim habitacional) (BRASIL, 2017).

O ciclo biológico e a transmissão do parasito iniciam-se quando o flebótomo realiza o repasto sanguíneo em humanos ou animais infectados (Figura 2). A fêmea ingere macrófagos parasitados com a forma amastigota, junto com o sangue e/ou linfa intersticial. Durante o trajeto pelo trato digestivo anterior, ou ao chegar ao estômago, esses macrófagos rompem-se e liberam as formas amastigotas. Essas formas sofrem divisão e transformam-se em promastigotas (Neves, 2005).

Os promastigotas passarão por processos sucessivos de divisão celular envoltas por uma membrana peritrófica, secretada pelas células do estômago do inseto. Após o terceiro ou quarto dia do repasto a membrana irá se romper e liberar formas promastigotas que ficam livres e continuam a divisão celular e poderão seguir dois caminhos diferentes pelo trato digestivo do inseto (Neves, 2005).

No primeiro caminho as formas promastigotas do subgênero *Viannia* dirigem-se para o intestino colonizando piloro e íleo. Nesse local transforma-se em paramastigotas, essas formas permanecerão aderidas pelo flagelo ao epitélio intestinal através de hemidesmossomas. Ocorrem novas divisões celulares e as paramastigotas migram para a faringe (região anterior do tubo digestivo). Na faringe elas atingem o estágio infectivo: as formas metacíclicas (Neves, 2005).

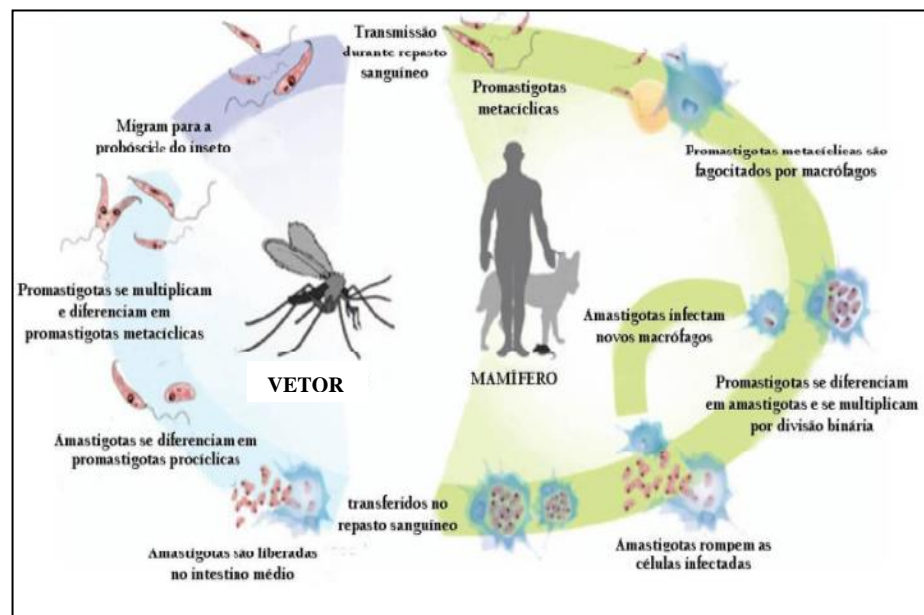
O segundo caminho, do subgênero *Leishmania*, ocorre com as formas promastigotas multiplicando-se de forma livre ou aderidas às paredes do estômago do inseto vetor. As promastigotas migram para a região anterior do estômago e diferenciam-se em paramastigotas colonizando o esôfago e faringe. Nesse local ocorre a diferenciação em formas infectantes metacíclicas. Esse ciclo leva de três a cinco dias (Neves, 2005).

As diversas espécies de *Leishmania* e a forma como será elaborada a resposta imune do hospedeiro são fatores que determinarão o quadro clínico e as manifestações clínicas da

doença (BRASIL, 2017; OPAS, 2021). No hospedeiro vertebrado, após o repasto do flebótomo e inoculação da forma promastigota na derme, inicia-se o ciclo do parasito no organismo e a resposta imune. A saliva do flebótomo atrairá para a área células fagocitárias mononucleares. Os macrófagos desempenham um papel importante nessa etapa.

Em alguns pacientes infectados, os macrófagos podem destruir o parasito e encerrar o processo infeccioso. As formas promastigotas transformam-se na forma amastigotas durante a fagocitose e iniciam a reprodução por divisões binárias sucessivas. Esse processo promove a atração de mais macrófagos ao sítio e estes são infectados. Toda essa ação leva ao surgimento de um infiltrado inflamatório composto por linfócitos e macrófagos na derme. Esses macrófagos possuem alta concentração de parasitas. (Neves, 2005).

Figura 2 - Ciclo biológico da Leishmaniose Tegumentar Americana



Fonte: Adaptado de Harhay, 2011.

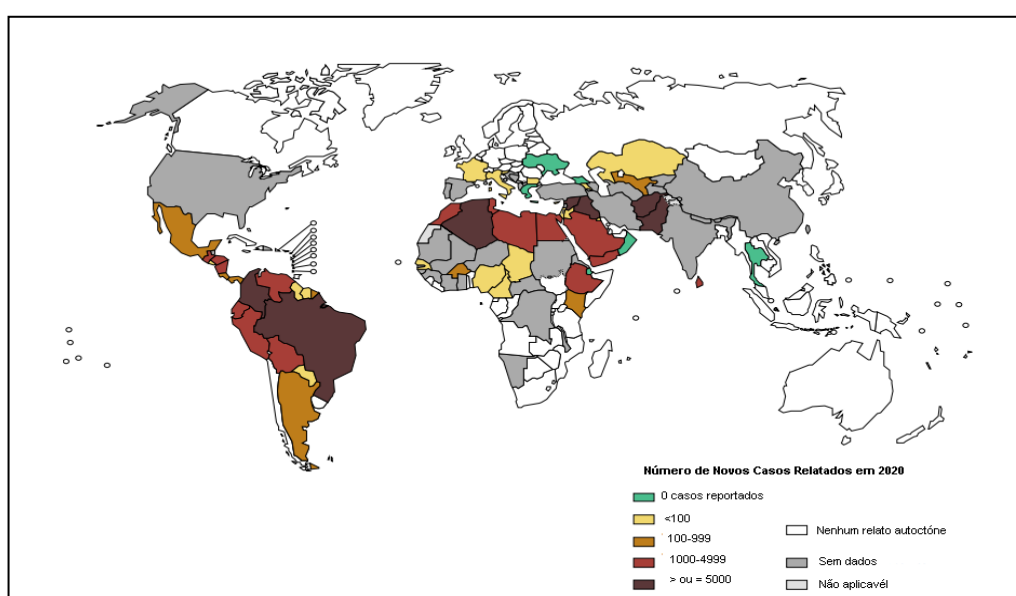
2.4 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

As leishmanioses ocorrem com maior frequência nas Américas, África e Ásia. Na atualidade a doença está presente em 102 países, distribuídos nas seis regiões de abrangência da OMS (Figura 3). Dos países que compõem o Mediterrâneo Oriental, o qual ocupa o primeiro lugar em nível de carga da doença, 82% são endêmicos para leishmaniose cutânea. A região das Américas é a segunda região com maior ocorrência de leishmaniose tegumentar. O

continente possui 36 países e destes, 21 (58%) deles são classificados como endêmicos pela OMS (WHO, 2021).

As condições climáticas, de habitação e exploração do meio ambiente fazem com que a doença nas Américas seja considerada zoonose com ciclos de transmissão silvestre, doméstico rural e doméstico urbano. Além dos casos da LTA em suas diversas formas clínicas, outro fator agravante é a coinfeção por *Leishmania* e HIV (*Human Immunodeficiency Virus*). Em 2018 o Brasil notificou à OPAS 168 casos (OPAS, 2021).

Figura 3 - Estado de Endemicidade da *Leishmaniose* Cutânea no Mundo, 2020.



Fonte: Adaptado a partir de WHO, 2021.

A LTA é uma doença de notificação compulsória obrigatória no Brasil conforme os dispostos da Portaria Gabinete Ministerial (GM)/MS N° 104 de 17 de fevereiro de 2016¹. Em 2020, o Brasil notificou à OPAS 16.432 novos casos de leishmaniose tegumentar com coeficiente de detecção médio de 15,4 casos/100 mil habitantes. Quanto ao tipo de leishmaniose tegumentar identificada: 15.732 casos (95,75%) eram do tipo cutânea, 692 (4,2%) do tipo mucosa e 08 (0,05%) não foram especificados (OPAS,2021).

A leishmaniose acomete mais homens, sendo o sexo masculino o gênero com mais de 70% dos casos no Brasil em 2020. Acredita-se que tal fator deve-se às condições de trabalho

¹ Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências.

como trabalhadores da agricultura e da colheita do fumo, exposição ao vetor e acesso aos serviços de saúde (OPAS, 2021).

Quanto à ocorrência de casos por região, identifica-se que a região norte é a região com maior concentração de casos. Essa região responde por 44,49% do total de casos notificados. As regiões: nordeste, centro-oeste e sudeste apresentam-se como endêmicas sendo responsáveis por cerca de 15% do total de casos cada uma. A região Sul apresenta um baixo número de casos e o estado do Paraná apresenta-se como o mais endêmico desta região (BRASIL, 2017).

Em uma análise espacial-temporal (2001-2017) dos casos de LTA no Brasil, Portella e Kraenkel, 2021 identificaram que foram notificados 379.571 (trezentos e setenta e nove mil e quinhentos e setenta e um) novos casos nesse período. Destes, quanto ao município de origem, identificou-se a presença de LTA em 73,87% dos municípios brasileiros. Uma incidência de 11,86/100.000 habitantes (Portella; Kraenkel, 2021).

A prevalência e maior ocorrência de LTA no Brasil continua sendo nos municípios da Amazônia Legal. Do total de casos notificados entre 2001 a 2017, identifica-se que 80% dos casos notificados ocorrem em 10% dos municípios da Amazônia Legal, localizados nos seguintes estados: Maranhão, Mato Grosso, Pará e Rondônia. Fora da Amazônia legal, há um *cluster* no estado da Bahia. No tocante a tendência da doença no território, observou-se que 24,2% dos municípios apresentaram diminuição de casos, 3,2% aumentaram e 72,5% não apresentaram tendência alguma (Portella; Kraenkel, 2021).

Na região Sudeste, Minas Gerais (MG) e São Paulo (SP) são os estados com maior número de casos. Entretanto, Espírito Santo (ES) e Rio de Janeiro, também são estados com municípios endêmicos para LTA (Portella; Kraenkel, 2021).

O estado do Rio de Janeiro, localizado na Região Sudeste do Brasil, possui 92 municípios e população em torno de 15.989.929 (quinze milhões e novecentos e oitenta e nove mil e novecentos e vinte e nove) cidadãos segundo o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de 2010. Na capital do estado, município do Rio de Janeiro, a população segundo censo de 2010 era de 6.320.446 (seis milhões e trezentos e vinte mil e quatrocentos e quarenta e seis) cidadãos. O estado caracteriza-se por uma elevada densidade populacional na região metropolitana (Soares *et al.*, 2020).

As formas de exploração, ocupação e organização dos modos de vida no espaço geográfico do estado do Rio de Janeiro ocorreu de forma desigual. Com aspectos geográficos diversificados e características geomorfológicas de terrenos extremamente acidentada e uma variedade de composição de relevo que vai desde a região serrana, baixadas e litoral. As mais

variadas explorações econômicas do território, da agricultura e atividade industrial, favoreceram a distribuição e ocorrência da LTA no território (Amari; Costa, 2017).

A LTA no estado do Rio de Janeiro é presente desde o Século XX. Sua presença é notável na capital do estado desde muito cedo nas pesquisas espaciais de ocorrência da doença, sendo a *L. (V) braziliensis* a espécie prevalente no estado (Carvalho; Dias; Rangel, 2014). A ocorrência da LTA na cidade do Rio de Janeiro teve um aumento significativo na década de 80. Em especial na Zona Oeste da cidade. O perfil epidemiológico é produto da grande diversidade ambiental e a distribuição espacial da LTA na capital surge a partir da diversidade de exploração do território para os modos de habitação e subsistência humana (Amaro; Costa, 2017).

Ao realizar uma análise espacial entre 1990-2012 da ocorrência da LTA no estado do Rio de Janeiro, Soares, *et al* 2020, mostra que os casos sempre ocorreram na capital do estado. Em todos os períodos avaliados é possível identificar que a doença se distribui nas mais diversas regiões do estado. Observa-se que entre os anos 2008-2012 o estado apresentou uma redução no número de casos. Dos 97 municípios do estado, 27 foram considerados de grande importância epidemiológica para a produção da LTA no estado. (Soares *et al.*, 2020).

A LTA no estado do Rio de Janeiro ocorre com maior frequência em homens, sendo que dos 5.263 casos notificados entre 1990-2012, 58,9% destes ocorreram em pacientes do sexo masculino. A LTA também acomete as crianças menores de 10 anos no estado, 8,6% dos casos notificados nesse período atingiu esse público (Soares *et al.*, 2020). O estado apresentou nos últimos anos uma diminuição de casos. Em 2004 apresentava um coeficiente de detecção de 1,44/100.000 habitantes e no ano de 2013 o coeficiente foi de 0,20/100.000 habitantes (Vita *et al.*, 2016).

A Tabela 1 a seguir apresenta o volume total de casos notificados por região de saúde² no estado do Rio de Janeiro entre 2010-2020 onde observa-se maior concentração dos casos nas regiões: Metropolitana I, Serrana e Centro-sul.

² Considera-se Região de Saúde o espaço geográfico contínuo constituído por agrupamento de Municípios limítrofes, delimitado a partir de identidades culturais, econômicas e sociais e de redes de comunicação e infraestrutura de transportes compartilhados, com a finalidade de integrar a organização, o planejamento e a execução de ações e serviços de saúde (Resolução CIT Nº 1 de 29 de setembro de 2011)

Tabela 1 - Casos confirmados e notificados de LTA no Estado do Rio de Janeiro entre 2010 a 2020

Região de Saúde*	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
01	10	3	1	1	1	2	1	-	6	5	3	33
02	1	3	-	1	2	1	2	-	-	2	2	14
03	5	7	3	2	2	1	1	2	7	14	5	49
04	3	2	1	3	-	5	1	6	5	9	2	37
05	54	54	34	12	9	11	18	17	31	29	21	290
06	1	1	3	1	2	1	-	1	1	4	1	16
07	4	7	1	2	8	2	2	4	5	2	4	41
08	14	4	4	2	3	1	-	1	2	2	1	34
09	20	8	6	8	7	5	5	4	14	9	12	98
Total	112	89	53	32	34	29	30	35	71	76	51	612

*01-Baía da Ilha Grande; 02-Baixa Litorânea; 03-Centro-Sul; 04-Médio Paraíba; 05-Metropolitana I; 06-Metropolitana II; 07-Noroeste;08-Norte; 09-Serrana

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan Net).

2.5 CONTROLE DA DOENÇA

A LTA é um agravo complexo caracterizado por uma grande diversidade de espécies de agentes, reservatórios e vetores. Esses fatores junto a situação epidemiológica da doença e a dificuldade da descentralização do diagnóstico e fragilidade nas ações de controle do vetor tornam a doença um grande desafio para os serviços públicos de saúde. Esse desafio é complexo tanto no âmbito do controle no território quanto no enfrentamento das complicações e consequências advindas dela (BRASIL, 2017).

Para definição do enfrentamento é necessária uma boa descrição dos casos humanos de acordo com a faixa etária, sexo, forma clínica e local de transmissão. A caracterização dessas áreas são ações primárias e vitais para assegurar que as intervenções futuras no cenário

endêmico sejam efetivas e capazes de reduzir a carga da doença no território (BRASIL, 2005).

O principal propósito das medidas de prevenção é reduzir o contato ou presença humana com a cadeia de transmissão. Para isso podem ser utilizadas medidas como: tratamento dos casos humanos, medidas de proteção individual para evitar o contato com o vetor, a identificação de possíveis hospedeiros animais e a aplicação de inseticidas quando possível. É importante salientar que essas estratégias devem ser flexíveis e adequadas as áreas de forma específica (MARZOCHI, 1997; BRASIL, 2017).

Em relação aos hospedeiros silvestres e domésticos, não são recomendadas nenhuma medida de controle. A eutanásia de animais domésticos pode ser realizada nos doentes em casos de agravamento das lesões que possam provocar sofrimento intenso ao animal. Não há recomendações para o tratamento dos animais doentes, já que o mesmo pode desencadear a resistência do parasito às drogas utilizadas para o tratamento em humanos. A educação em saúde ainda desponta como uma excelente forma de conscientizar os profissionais de saúde e a população em geral e contribuir para o controle da doença no território (BRASIL, 2017).

A grande quantidade de cobertura florestal, alta diversidade de possíveis espécies de mamíferos hospedeiros e as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do vetor são fatores típicos e desafiadores no enfrentamento da LTA na Amazônia Legal. A abordagem da LTA requer um conhecimento adequado da epidemiologia local, identificação de quais espécies de vetores e de hospedeiros estão envolvidos, seus *habitats*, área de combate ao vetor e sazonalidade (Portella; Kraenkel, 2021).

O padrão de transmissão da LTA no Brasil é altamente variável. Ainda pouco se sabe sobre a ecologia de espécies vetores e de reservatórios de mamíferos envolvidos no ciclo de transmissão em muitas regiões do país (Portella; Kraenkel, 2021). Os países das Américas são signatários no Plano de Ação Para a Eliminação de Doenças Infecciosas Negligenciadas e Ações Pós-Eliminação 2016-2020. Porém, o enfrentamento e a diminuição da carga da doença no país continua sendo um grande desafio para os órgãos governamentais, instituições de ensino e pesquisa e profissionais da saúde. (OPAS,2021).

2.6 APRESENTAÇÃO CLÍNICA E TRATAMENTO NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

2.6.1 Apresentação clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana

As várias formas clínicas da doença dependem da espécie do parasito infectante, do vetor, dos reservatórios, das características geográficas. Os aspectos clínicos da doença vão desde pacientes assintomáticos até pacientes com a forma difusa da doença. Essa forma provoca lesões disseminadas por todo o corpo (Sato, 2017).

A LTA tem duas principais classificações clínicas: Leishmaniose Cutânea e a Leishmaniose Mucosa (BRASIL, 2017). Na Leishmaniose Cutânea pode se observar as seguintes formas: forma cutânea localizada única ou múltipla. A primeira forma apresenta lesões únicas (típicas) ou múltiplas. A forma cutânea disseminada caracteriza-se por apresentar lesões múltiplas (mais de 10) acometendo várias partes do corpo. A forma recidiva cútis manifesta-se com a reativação de lesão cicatrizada previamente e a forma cutâneo difusa caracteriza-se por lesões infiltradas atingindo grandes extensões (BRASIL, 2017, OPAS 2021).

No Brasil, a *L. (V.) brasiliensis* é causadora das formas cutânea localizada única, múltipla, cutânea disseminada e recidiva cútis. A *L. (L.) amazonensis* é responsável por todas as formas cutâneas descritas. A *L. (V.) guyanensis* é responsável pelas formas localizada única, múltipla e disseminada. As espécies *L. (V.) naiffii*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* são responsáveis pelas formas localizadas e múltiplas da doença (BRASIL, 2005).

A leishmaniose mucosa caracteriza-se por manifestações metastáticas e acometem principalmente mucosa nasal e oral. A manifestação da forma mucosa pode ser secundária à lesão cutânea e pode manifestar-se tardiamente (meses ou anos após a lesão inicial primária). Essa forma clínica provoca lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens (Neves, 2010).

A LTA na forma mucosa pode ser categorizada em: formas: mucosa tardia, em pacientes que já apresentaram em algum momento lesões cutâneas; mucosa concomitante, quando a lesão mucosa ocorre com a lesão cutânea, mas em local anatômico distante; mucosa contígua, quando ocorre a extensão da lesão cutânea; mucosa primária, lesões primariamente em lábios e/ou genitais e mucosa indeterminada, quando não há história de lesões cutâneas prévias (OPAS 202).

No Brasil, essas formas clínicas podem ser causadas pela *L. (V.) brasiliensis*, já as espécies *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* podem causar a forma mucosa contígua (BRASIL, 2005, 2017; OPAS 2021).

As lesões iniciais da LTA são semelhantes. Essas lesões podem regredir e evoluir para cura espontânea (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2017). A lesão inicial caracteriza-se como um nódulo dérmico no local da picada do vetor. Esses nódulos possuem como aspectos histológicos a

hipertrofia do extrato córneo com acúmulo de histiócitos. Nesse local os parasitos irão se multiplicar, iniciando-se um processo de infiltrado celular circundado a lesão, com pequenos e grandes linfócitos e alguns plasmócitos (Neves, 2005).

Todo esse processo desencadeia uma reação inflamatória do tipo tuberculóide que culmina com a formação de uma lesão úlcero-crostosa. Essas lesões caracterizam-se por bordas ligeiramente salientes e por fundo recoberto por exsudato seroso ou seropurulento. A evolução da lesão desenvolve uma úlcera típica. Essa úlcera tem configuração circular, com bordas elevadas, fundo granuloso e cor vermelho intenso. (Neves, 2005).

A partir da lesão inicial, ou de forma simultânea, pode ocorrer a disseminação linfática ou hematogênica, levando ao surgimento de metástases cutânea, subcutânea ou mucosa. Essas lesões são altamente características, nos aspectos morfológicos, das leishmanioses e são facilmente reconhecidas por clínicos com experiência na área diagnóstica da doença. Após o tratamento, essas lesões evoluem para uma cicatriz bem característica com uma leve depressão e fibrose no local (BRASIL, 2017).

2.7 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A confirmação da LTA envolve o diagnóstico clínico epidemiológico do paciente e o diagnóstico laboratorial. O diagnóstico laboratorial recomendado envolve basicamente 3 grandes grupos de análises: as técnicas parasitológicas, as técnicas imunológicas e as técnicas moleculares. Alguns estados, municípios e hospitais universitários adotam as técnicas moleculares (BRASIL, 2017). O diagnóstico parasitológico se dá com a demonstração direta do parasito, as técnicas imunológicas avaliam a presença de anticorpos anti-*Leishmania* e a resposta celular frente ao extrato lisado do parasito e as técnicas moleculares avaliam a presença de DNA do parasito nas amostras pesquisadas (OPAS, 2021).

2.7.1 Resposta imune da LEISHMANIOSE Tegumentar Americana

A resposta imune à LTA é complexa e envolve uma interação dinâmica entre o parasita do gênero *Leishmania* e o sistema imunológico do hospedeiro humano (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Inicialmente, as leishmânias são fagocitadas por macrófagos, onde se replicam no interior das células. A resposta imune celular é fundamental na defesa contra a infecção, sendo as células T CD4+ e CD8+ cruciais na ativação e controle da replicação parasitária (Von Stebut, 2007).

A produção de citocinas, como o interferon-gama (IFN- γ), é central para a ativação dos macrófagos, conferindo-lhes capacidade microbicida. No entanto, em algumas situações, uma resposta imune pode ser prejudicial, resultando em uma forma crônica da doença. A polarização para uma resposta imune do tipo Th1 é associada à cura espontânea, enquanto uma resposta Th2 está relacionada à progressão da doença (Barral Netto *et al*, 1998).

Além disso, outros componentes do sistema imunológico, como células *natural killer* (NK) e anticorpos, também desempenham papéis importantes na resposta contra o LTA (Maurer *et al*, 2006). O entendimento detalhado dessa complexa interação entre parasita e sistema imunológico é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e vacinas eficazes contra a LTA (CONCEIÇÃO-Silva, Leite-Silva; Morgado, 2018).

2.7.2 Diagnóstico clínico

A localização, número e características morfológicas das lesões, sintomas da doença e história clínica são essenciais na avaliação do paciente suspeito para LTA (Gomes *et al.*, 2014). Entretanto tal método mostra-se frágil, uma vez que a Leishmaniose necessita de diagnóstico diferenciado para outras doenças. (OPAS, 2021).

O diagnóstico clínico deve ser complementado com algum outro método de diagnóstico laboratorial dado o elevado número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA. Dentre as doenças, recomenda-se prioritariamente o diagnóstico diferenciado para: úlcera piogênica, furúnculo, sífilis, micobactérias atípicas, tuberculose cutânea, hanseníase, cromoblastomicose, esporotricose, histoplasmose, lobomicose, paracoccidiodomicose, ectima e impetigo (BRASIL, 2017; OPAS, 2021).

Recomenda-se ainda, o diagnóstico diferenciado para reações inflamatórias reativas como úlceras venosas, lúpus, pioderma gangrenoso, dentre outros. Os tumores (carcinoma basocelular e espinocelular, ceratoacantoma, linfoma cutâneo e cútis) também devem ser considerados no diagnóstico diferencial (OPAS, 2021).

2.7.3 Diagnóstico parasitológico

São métodos simples e consistem na pesquisa do parasito, identificando através de pesquisas microscópicas, as formas amastigotas em material proveniente de lesões ativas coletadas através de punção aspirativa da borda ou do fundo da úlcera, escarificação das

bordas da lesão ou *imprints* das biópsias da lesão (OPAS, 2019). O método de demonstração direta do parasito é a de primeira escolha por ser rápido, fácil e de baixo custo.

Em caso de resultados negativos, mas com alta suspeição clínica, recomenda-se a repetição do exame ou associação com outros métodos diagnósticos. (OPAS, 2021). A probabilidade de resultados positivos é inversamente proporcional ao tempo de curso da doença. A sensibilidade do exame pode ser afetada em casos de infecções secundárias (BRASIL, 2017).

Para a coleta de material por punção aspirativa utiliza-se injeção com solução salina estéril na borda da lesão ou linfonodo. A escarificação de borda consiste na raspagem da borda interna da úlcera ou na superfície de lesões fechadas. Para a realização da escarificação utiliza-se lâminas de bisturi estéreis ou estiletes. Já os *imprints*, realizam-se através da compressão leve de fragmento de tecido, extraído através de biópsia, sobre uma lâmina de vidro. O material coletado deve ser fixado em lâminas de vidro e coradas com corantes específicos (OPAS, 2019).

A histopatologia permite avaliar cortes histológicos preparados e corados de forma específica a fim de se observar as formas amastigotas e todo processo patológico desenvolvido na área da lesão. Esse método permite o diagnóstico diferencial do parasito com outros agentes de doenças que podem confundir o clínico (Gomes *et al.*, 2014; OPAS, 2021). A efetividade desta técnica pode ser aumentada através da utilização da imunohistoquímica e/ou imunocitoquímica, que permitem a visualização através da deposição de coloração onde ocorre a maior concentração de parasitos (Gurel *et al.*, 2020)

O método de cultivo *in vitro* permite a identificação de promastigotas do parasito envolvido. Neste método retira-se fragmentos cutâneos ou de mucosa e eles são inoculados em meio de cultivo específico em meios bifásicos com ágar sangue modificado (*Neal, Novy e Nicolle* (NNN) e meio líquido *Schneider's* na faixa de temperatura entre 24°C e 26°C (Mann *et al.*, 2021). A leitura deve ocorrer semanalmente durante um período de 30 dias (BRASIL, 2017). A partir do cultivo inicial é possível a realização da expansão da massa parasitária e a realização da eletroforese de isoenzimas para determinação das espécies envolvidas (Cupolillo *et al.*, 1997). Uma outra opção de obtenção de material para cultivo ocorre por meio de punção com tubo selado a vácuo contendo meio de cultura (BRASIL, 2017).

O isolamento *in vivo* consiste na obtenção de material através de biópsia ou raspado de lesão e trituração deste em solução salina estéril. Após a trituração, o mesmo é inoculado em via intradérmica na mucosa da região nasal e/ou patas de *hamster* (*Mesocricetus auratus*). O desenvolvimento de lesões pode ocorrer em até 30 dias e o acompanhamento do animal

inoculado deve ocorrer num período entre três a seis meses. É um método de custo elevado e complexo e de pouco uso na prática clínica. O método *in vivo* possui elevada sensibilidade quando comparado com os demais métodos parasitológicos (BRASIL, 2017).

Os exames parasitológicos, apresentam como vantagens o baixo custo, por exigir parque tecnológico mais simples, apresentam maior praticidade na execução dos procedimentos de coleta, transporte, análise e conclusão (OPAS, 2019). Alguns exames parasitológicos apresentam boa sensibilidade. Entretanto apresentam como limitações a dependência da resposta imune do hospedeiro, localização, tempo de evolução da doença e de tratamentos prévios realizados pelo paciente (Ferreira; Moraes, 2013).

Outro fator limitante dos exames parasitológicos deve-se ao fato de que a experiência e habilidade de quem coleta, prepara e realiza a leitura dos exames (laboratorista) pode ser essencial no fechamento do diagnóstico dando a subjetividade de quem avalia a lâmina bem como de fatores operacionais como a contaminação da cultura ou a má qualidade das colorações. (OPAS, 2019).

2.7.4 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) representa um avanço significativo na abordagem clínica dessa doença parasitária. Métodos baseados em ácidos nucleicos, como a ocorrência na *Polimerase Chain Reaction* (PCR), se destacam por sua sensibilidade e especificidade na detecção da parasita do gênero *Leishmania*.

O diagnóstico através do método de PCR baseia-se na amplificação do DNA do parasito em diferentes amostras coletadas (pele e mucosa). O método utiliza diversos alvos moleculares que podem ser gênero-específicos ou espécie-específicos. A PCR possui alta sensibilidade e especificidade para diagnóstico de LTA uma vez que possui capacidade de detecção mesmo em casos de baixa carga parasitária (Medeiros *et al.*, 2017).

A PCR é um método de alto custo e que exige infraestrutura de laboratório avançada e protocolos de coleta, armazenamento e análise de amostras de alta qualidade. Esses protocolos atuam como fator de prevenção ao risco de contaminação durante a realização dos exames (BRASIL, 2017). Além disso, técnicas como o PCR oferecem vantagens adicionais, como a quantificação da carga parasitária, ou que podem ser úteis para monitorar a eficácia terapêutica.

2.7.5 Diagnóstico imunológico

A Intradermoreação de Montenegro (IDRM) é um teste de hipersensibilidade tardia que consiste na aplicação intradérmica de antígenos de *Leishmania* spp. e na observação da resposta antigênica entre 48 a 72 horas após a aplicação com endurecimento no local da aplicação como mecanismo confirmatório (Ferreira; Moraes, 2013). O IDRM apresenta como limitações os resultados falsos positivos e a possibilidade de reações alérgicas que podem cruzar com os resultados. É um teste simples e amplamente utilizado nos serviços públicos de saúde. Sendo em alguns locais a única opção diagnóstica possível (BRASIL, 2017).

O IDRM foi introduzido no Brasil em 1926, possui boa aplicabilidade clínica e baixo custo, tem alto valor preditivo e apresenta boa sensibilidade e especificidade. Por muitos anos foi considerado o padrão ouro no Brasil para o diagnóstico para LTA, principalmente em áreas remotas com pouco ou nenhum acesso à rede laboratorial. Entretanto sua produção foi descontinuada no Brasil em razão da suspensão da produção do antígeno. Destaca-se que tal suspensão deixou muitos municípios e serviços de referência sem nenhuma, ou reduziu, opção de método diagnóstico para LTA (BRAZ, 2019).

A resposta imune às Leishmanioses ainda é pouca esclarecida nas pesquisas clínicas (CONFORT, 2009). O diagnóstico sorológico para a leishmaniose busca identificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. A detecção de anticorpos demonstra limitação em razão da sensibilidade e especificidade serem dependentes do tipo, fonte e pureza dos antígenos utilizados e ainda por conta da menor produção de anticorpos no curso da LTA. (CONFORT, 2009; OPAS, 2019).

A Imunofluorescência Indireta (RIFI) é um método que consiste na reação dos anticorpos presentes na amostra do paciente em relação a um antígeno de promastigotas fixado em uma lâmina de microscopia (Voltarelli, 2009). Após as etapas de lavagem e inserção de um anticorpo anti-humano (conjugado), observa-se a reação de fluorescência ao microscópio. A ocorrência de fluorescência é um indicativo da presença do anticorpo.

A RIFI pode apresentar algumas limitações de diminuição em sua acurácia limitada em algumas fases da doença e reações cruzadas com outros tripanossomídeos. Sabe-se ainda que a circulação de anticorpos pode não significar que o quadro infeccioso esteja instalado (Mendes *et al.*, 2019). Aspectos relacionados a infraestrutura necessária para realização do exame, qualidade do sistema de iluminação e subjetividade da leitura também podem comprometer o desempenho do exame (Voltarelli, 2009).

Os ensaios imunoenzimáticos são testes que permitem a obtenção de resultados qualitativos e quantitativos e podem ter objetivo de detectar antígenos ou anticorpos. Nesse tipo de teste observa-se o produto da mudança de cor, a partir da interação enzima-substrato, para a medição da reação entre o antígeno-anticorpo (Voltarelli, 2009; BRASIL, 2017).

Um dos fatores que podem favorecer ou comprometer a precisão do ELISA é a padronização dos parâmetros. Para a constituição dos conjugados enzimáticos deve se garantir a presença de anticorpos de alta afinidade e com alto grau de purificação. A degradação enzimática do substrato cromogênico utilizado dá origem a produtos solúveis coloridos. A leitura destes produtos é realizada medindo-se a densidade óptica da solução por espectrofotometria para determinação dos resultados (Voltarelli, 2009).

O ELISA apresenta maior positividade na LTA quando realizado na fase inicial da doença na forma cutânea e nos casos graves. A espécie envolvida também influencia na positividade do exame, sendo menos sensível para a *L. (V) guyanensis* (Ferreira; Moraes, 2013). Pode também ser utilizado para a avaliação do controle da cura, associando-se a negatização dos títulos com a cicatrização das lesões e ao bom prognóstico. Pacientes com coinfeção HIV podem apresentar falso negativo, uma vez que os medicamentos fungicidas e antirretrovirais podem interferir na capacidade de detecção do parasito no teste (Medeiros *et al.*, 2017).

O ELISA é um método diagnóstico para LTA que apresenta alta sensibilidade e especificidade (Sato, 2017). Possui potencial para: diagnosticar a LTA quando os pacientes apresentam alta suspeição clínica e apresentam exame parasitológico negativo. Assim ele pode atuar como fator esclarecedor para diagnóstico diferenciado em relação a outras doenças e no controle da cura ou processo de recidiva da doença (CONFORT, 2009).

Uma das desvantagens do ELISA é a necessidade de um parque tecnológico e biológico que demandam elevados investimentos financeiros, bem como de mão de obra qualificada. No Brasil o ELISA para diagnóstico da LTA é utilizado somente em estabelecimento de ensino e pesquisa, em sua maioria, instituições públicas e localizadas em regiões metropolitanas (BRASIL, 2017).

2.7.6 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana

O tratamento da LTA deve iniciar após a confirmação do diagnóstico clínico e laboratorial e deve considerar: manifestações clínicas, número e localização das lesões, a espécie do parasito, localização geográfica, estado clínico geral do paciente e o arsenal

terapêutico disponível. A avaliação do paciente deve incluir uma anamnese minuciosa seguida da realização de algum exame para confirmação da doença (BRASIL, 2017).

Após a confirmação diagnóstica o paciente deve ser submetido a uma avaliação otorrinolaringológica para identificação da presença de lesões na mucosa. A avaliação pré-tratamento deve incluir exames de rotina como hemograma, bioquímica (glicose, ureia, creatinina, TGO/AST, TGP/ALT, fosfatase alcalina, gama-GT, amilase e lipase), para mulheres solicitar beta-HCG (em razão do medicamento ser teratogênico), sorologia para HIV (para aquelas pacientes com forma clínica ou evolução incomum) e eletrocardiograma (BRASIL, 2017).

Nas Américas a droga de primeira escolha para o tratamento são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina (intravenosa ou intramuscular). A anfotericina B lipossomal (intravenosa), isotionato de pentamidina (intramuscular), desoxicolato de anfotericina B (intravenosa) e a miltefosina (oral) são indicados em caso de ineficácia de resposta da primeira escolha. São também indicadas em situações de contraindicação e quando apresentarem igual ou melhor resposta e segurança clínica para o paciente quando comparadas com os antimoniais (OPAS, 2021).

A realização de exames de monitoramento semanal (exames bioquímicos e de imagem) é recomendação com grande importância para a detecção de possíveis efeitos secundários da medicação tais como arritmia cardíaca e toxicidade hepática. Além dos exames de monitoramento durante a intervenção clínica, recomenda-se também a realização de exames de controles periódicos em intervalos de 45 a 90 dias após o término do seguimento clínico. Esse monitoramento deve ocorrer com frequência de até 6 meses pós-tratamento (OPAS, 2021).

O tratamento com os antimoniais pentavalentes têm sido objeto de pesquisa e discussão ampla nos últimos anos. O uso dos antimoniais, seja endovenoso ou intramuscular têm sido questionados, em especial, para pacientes acima de 50 anos dado os efeitos adversos clínicos. Nessa perspectiva, o tratamento intralesional (IL) com antimoniato de meglumina (AM) para pacientes acima de 50 anos surge como uma nova opção terapêutica (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2021).

A recomendação do tratamento IL da Leishmaniose cutânea com AM passou a ser recomendada no Brasil a partir de 2017 pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017). As experiências e estudos para avaliação dos resultados e efeitos adversos ainda são poucos (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2021). Os efeitos adversos mais comuns têm sido eventos locais (prurido, edema e dor local), sistêmicos (mialgia, artralgia e cefaleia) (Fernandes, 2019).

Em estudo de coorte recente os dados com tratamento IL com AM demonstram perspectivas positivas para a adoção desta modalidade de tratamento para Leishmaniose cutânea. Os resultados da coorte demonstraram baixo nível de toxicidade, boa eficácia e uma menor taxa de abandono quando comparado com esquemas padrão de tratamento (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2021). Demanda pouca infraestrutura, é uma técnica de fácil reprodutibilidade e apresenta alta resolutividade quando realizado no âmbito da atenção primária à saúde (De Oliveira Duque *et al.*, 2019).

Os serviços de atenção primária à saúde, ou ambulatórios especializados, têm uma alta taxa de abandono do tratamento bem como ainda enfrentam casos de efeitos adversos que podem levar a interrupção do tratamento e/ou à geração de danos ou óbito do paciente. Nesse sentido trabalhar a prevenção quaternária no âmbito do enfrentamento da LTA está posto como um desafio para o SUS (De Oliveira Duque *et al.*, 2019).

Com objetivo de detectar possíveis recidivas cutâneas e comprometimento de mucosa. Considera-se como critério de cura, após três meses de tratamento a cicatrização com reepitelização completa e nivelamento epidérmico da borda das lesões, não endurecimento da base da lesão, ausência de problemas otorrinolaringológicos e o não aparecimento de novas lesões (OPAS, 2021).

3 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LapClinVigileish) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/Rio de Janeiro) é composto de um setor laboratorial e um setor ambulatorial, sendo um importante centro de ensino e pesquisa no âmbito das Leishmanioses. Constitui-se um dos centros de referência no diagnóstico da LTA.

O ambulatório do LapClinVigiLeish recebe pacientes com suspeita de Leishmanioses que necessitam de diagnóstico e/ ou tratamento, pacientes com falhas terapêuticas ou com comorbidades que dificultam a condução do tratamento. Esses pacientes podem ser provenientes de unidades de saúdes públicas ou privadas. Deste modo, configura-se o atendimento de um contingente expressivo de pacientes suspeitos de LTA, dentro e fora do Estado do Rio de Janeiro.

As várias pesquisas já realizadas a partir deste centro (CONFORT, 2009; Barroso-Freitas, 2009) e sua importância para a saúde pública no Brasil e no mundo faz com que as práticas clínicas e de pesquisa desenvolvidas passem por constante aprimoramento e inovação. Nesse sentido em sua prática clínica ambulatorial, os profissionais que atendem os pacientes com suspeita de LTA realizam a coleta de material biológico para a realização dos métodos diagnósticos (exame direto/*imprint*, cultura *in vitro* do parasito, histopatologia, reação em cadeia da polímeras (PCR) e os testes sorológicos - ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis*) recomendados pelo Ministério da Saúde. Toda essa cadeia de rastreamento, diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes gera um grande banco de amostras biológicas e de dados secundários sobre a etiologia, patogênese, resultados diagnósticos e desfechos da LTA.

Em relação ao diagnóstico sorológico para LTA o LapClinVigiLeish utiliza o ELISA *in house* que já foi alvo de estudos apresentando resultados promissores. É um teste que utiliza antígeno espécie específico *L. (V.) brasiliensis*, espécie responsável por uma grande casuística da doença no país, o que aumenta a acurácia na detecção de anticorpos em pacientes com LTA (Ribeiro *et al.*, 2007; Barroso-Freitas *et al.*, 2009; CONFORT, 2009). Este teste já vem sendo utilizado pelo grupo por mais de vinte anos, mostrando ser uma plataforma útil no imunodiagnóstico e acompanhamento sorológico do tratamento dos pacientes atendidos no ambulatório do LapClinVigiLeish.

O ELISA têm sido objeto de estudos diversos em todo território nacional, no intuito de

buscar avaliar seu desempenho para o diagnóstico da LTA (Zanetti *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2019). Apesar do elevado número de casos no Brasil e no Continente Americano, a produção tecnológica e a disponibilização de novos métodos diagnósticos para os serviços públicos de saúde ainda são limitadas (Oliveira, 2016). O ELISA, apesar de demandar um parque tecnológico considerado complexo, destaca-se por ser um teste realizado de forma automática, em larga escala e de fácil reprodutibilidade e com facilidade de implementação em centros diagnósticos públicos. Os testes de ELISA comerciais não empregam antígenos homólogos quando comparados às técnicas adotadas no INI/FIOCRUZ. Tal característica reduz a especificidade desses testes para LTA. O uso de antígenos homólogos, assegura maior especificidade do teste e acurácia no diagnóstico.

Destaca-se também que ao comparar a técnica de coleta, análise e resultado do ELISA em relação às outras técnicas diagnósticas observa-se que algumas limitações nos outros testes. Dentre as limitações pontua-se que alguns testes são invasivos como a biópsia, a IDR. Soma-se a isso a necessidade de repetição de coleta de material biológico em algumas técnicas em razão de contaminação da amostra, o transporte de amostras biológicas específicas para o diagnóstico ser dificultoso, a possibilidade de reação cruzada com outras doenças e a segurança e qualidade do paciente. Nesse sentido, trabalhar com o ELISA antígeno específico constitui-se numa importante medida que permite o aperfeiçoamento da técnica e a especificidade do diagnóstico.

No âmbito do Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ este projeto situa-se dentro da Linha de Pesquisa “Saneamento e Saúde Ambiental Inclusive Infantil”. Em relação ao Meio Ambiente a LTA destaca-se como uma doença tropical que se desencadeia a partir das relações do homem com o meio ambiente a partir da relação de desequilíbrio e exploração deste, quer seja para a sobrevivência, turismo ou habitação. Enquanto objeto de pesquisa no âmbito da Saúde Coletiva a LTA persiste como um grave problema de Saúde Pública e evoca a necessidade de pesquisas que possam elucidar questionamentos ainda não esclarecidos. E por fim na temática do cuidado em saúde têm-se a necessidade constante de novas formas de diagnósticos para LTA bem como de revisar aquelas já em uso nos serviços de saúde.

Considerando o exposto acima e que: (1) a LTA é uma doença de amplo espectro clínico e os sinais clínicos não são patognômicos da doença, (2) o bom desempenho e a facilidade que o ELISA *in house* com antígeno bruto de *L. (V.) brasiliensis* apresenta para o diagnóstico da LTA, (3) a necessidade de opções diagnósticas com maior simplicidade em sua realização laboratorial e na obtenção e transporte da amostra clínica, (4) a necessidade de

revisar métodos diagnósticos já recomendados, como forma de avaliar sua efetividade bem como estabelecer o apoio diagnóstico a LTA, (5) a pouca informação encontrada na literatura quanto a capacidade do ELISA ser adotado como método diagnóstico em qualquer fase da LTA e (6) a grande quantidade de informação retrospectiva em relação ao diagnóstico clínico e laboratorial da LTA no LapClinVigiLeish INI/Fiocruz.

Esse trabalho busca realizar uma avaliação do ELISA *in house* que utiliza como antígeno extrato bruto de *L. (V.) brasiliensis* no apoio ao diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em pacientes atendidos no período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz, RJ.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* em apoio ao diagnóstico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas na Fiocruz no período de 2000 a 2005.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a população de estudo com Leishmaniose Tegumentar Americana e seu perfil diagnóstico nas técnicas parasitológicas (cultivo *in vitro*, histopatologia, exame direto/Imprint) e no ELISA *in house* com *L. (V.) brasiliensis*.
- Apresentar a concordância entre o ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* com os testes parasitológicos de cultivo *in vitro*, de histopatologia e de exame direto/Imprint.
- Comparar as respostas sorológicas do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana em suas diferentes formas clínicas: a leishmaniose tegumentar (LT), a leishmaniose mucosa (LM), a leishmaniose cutânea mucosa (LCM).
- Analisar a resposta sorológica do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* dos pacientes frente as características clínicas das lesões de Leishmaniose Tegumentar Americana.

5 METODOLOGIA

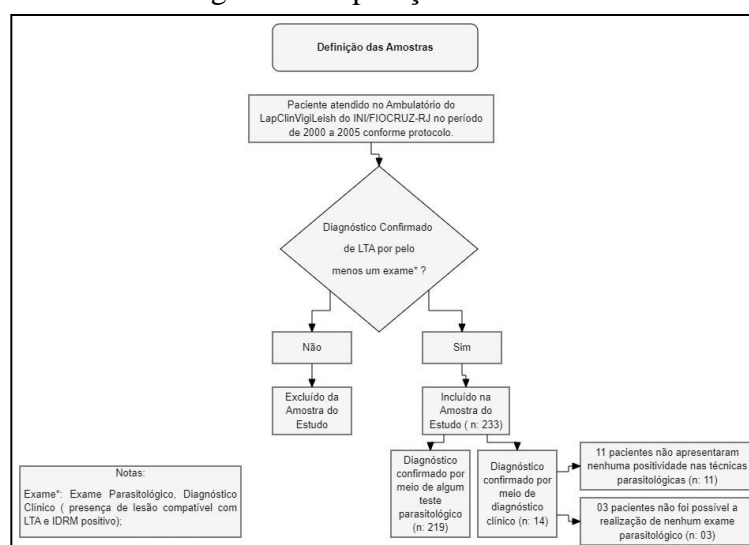
5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo com avaliação de dados secundários previamente obtidos de pacientes com LTA com enfoque no desempenho do ELISA *in house* com antígeno espécie específica de *L. (V.) brasiliensis*. Esses pacientes tiveram as informações colhidas na ocasião do primeiro atendimento durante a investigação clínica de LTA no ambulatório do LapClinVigiLeish no período de 2000 até 2005. O período de estudo buscou assegurar um banco de dados robusto e qualitativo para análise estatística, bem como buscar complementar outros estudos realizados no mesmo centro de pesquisa com períodos até o ano 2000.

5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para esse estudo os critérios de inclusão são: pacientes submetidos ao protocolo de investigação clínica com diagnóstico confirmado de LTA. Considera-se como diagnóstico confirmado os pacientes positivos em um dos exames parasitológicos realizados (presença de amastigotas ou promastigotas) ou por diagnóstico clínico para a doença (pacientes com lesão clínica compatível com LTA, com IDRMs positiva, tratamento para a doença com cura clínica) conforme a Figura 4.

Figura 4 - População do Estudo



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 MONTAGEM DO BANCO DE DADOS E COLETA DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS E DIAGNÓSTICAS DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Os bancos internos do setor foram construídos com informações ao longo de anos de trabalho pela equipe médica, de enfermagem e laboratorial durante o atendimento dos pacientes suspeitos de LTA. Essas informações foram colhidas e organizadas pelo grupo para realizações de pesquisas científicas diversas no tema Leishmanioses com informações epidemiológicas, clínicas e laboratoriais

Para este trabalho atual, novos bancos de dados foram construídos por meio do recorte das variáveis de interesse a serem analisadas: 1) características clínicas das lesões de LTA (presença de lesões associadas ao quadro clínico de LTA), 2) formas clínicas dos pacientes com LTA, 3) informações dos resultados dos testes laboratoriais do ELISA *in house*, do cultivo *in vitro* do parasito, do exame direto/*imprint* e da histopatologia. Essas variáveis foram consultadas nos bancos internos do LapClinVigileish. Todas as informações que foram necessárias e não estavam contidas nos bancos de dados principais foram obtidas através dos prontuários eletrônicos dos pacientes, através do acesso ao sistema eletrônico de prontuários SIPEC – INI (<http://intranet.ini.fiocruz.br>) do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas (IPEC). Por isso, não foi necessária à coleta de amostras clínicas ou de dados recentes.

Os pacientes foram divididos levando em consideração as formas clínicas da LTA: pacientes com leishmaniose tegumentar (LT) que apresentavam somente lesões em pele, pacientes com leishmaniose mucosa (LM) que apresentaram lesões somente em mucosas e pacientes com leishmaniose cutaneomucosa (LCM) que apresentaram lesões em mucosas e pele (BRASIL, 2017). Os testes parasitológicos foram considerados positivos quando apresentaram parasito na forma amastigota (exame direto/*imprint* e histopatologia) ou promastigota (cultivo *in vitro*) e negativos quando não apresentaram parasitos na forma amastigota ou promastigota.

Foram ainda avaliadas as respostas sorológicas por meio dos valores da densidade óptica (DO) (reator ou não reator) e da Unidade Arbitrária (UA). É importante informar que para essa avaliação foi levado em consideração somente o primeiro resultado do ELISA *in house* realizado no ato da primeira consulta, ou seja, o teste realizado no ato do diagnóstico inicial para LTA. Os resultados do ELISA *in house* de acompanhamento do tratamento dos pacientes não foram considerados para este estudo.

5.3.1 Critérios de elegibilidade para a população de estudo

Foram considerados como critérios de inclusão as informações de todos os pacientes com LTA atendidos no ambulatório do LapClinVigiLeish, em processo de diagnóstico, que tenham sido submetidos a coleta de sangue para realização do ELISA *in house* e submetidos ainda ao protocolo de atendimento e protocolo de diagnóstico realizado pelo setor (conforme descrito no item 5.5), na primeira consulta, ainda sem a instituição do tratamento. Os dados dos pacientes atendidos que não foram submetidos ao ELISA *in house* ou ao protocolo diagnóstico do setor (descrito no item 5.4), os pacientes encaminhados já em tratamento para LTA e resultados de ELISA *in house* provenientes de amostras externas ao LapClinVigiLeish para o diagnóstico da doença, não foram considerados para este estudo.

5.4 ANÁLISES REALIZADAS PARA A AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO ELISA *IN HOUSE* COM ANTÍGENO DE *L. (V.) BRASILIENSIS* EM APOIO AO DIAGNÓSTICO DO PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

5.4.1 Descrição da população de Estudo e do Perfil dos Resultados dos Testes Parasitológicos e do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis*

Foram analisados de forma descritiva o perfil diagnóstico da população através da avaliação descritiva das médias, dos valores máximos e valores mínimos e percentual dos resultados dos testes parasitológicos (cultivo *in vitro* do parasito, histopatologia, exame direto/*imprint*) e do ELISA *in house* com descrição dos resultados de forma individual e sua comparação com os resultados do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis*.

5.4.2 Concordância entre o ELISA *in house* com Antígeno de *L. (V.) brasiliensis* com o Cultivo *in vitro*, a Histopatologia e o Exame direto/*imprint*

Para essa análise da concordância foram utilizados os resultados do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* (reagente / não reagente) de todos os pacientes com LTA (com diagnóstico parasitológico e clínico) em correspondência com os resultados dos exames parasitológicos de cultivo *in vitro*, exame direto/*imprint*, histopatológico e parasitológico geral (presença de algum exame parasitológico positivo, com presença de amastigotas/promastigotas em qualquer dos testes realizados). Os testes parasitológicos foram

considerados positivos quando nos testes foi detectada a presença de promastigotas / amastigotas, negativo quando nos testes os promastigotas / amastigotas não foram encontrados

5.4.3 Descrição das respostas sorológicas do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* dos pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana nas diferentes Formas clínicas da doença

Foram avaliadas as respostas sorológicas utilizando os parâmetros densidade óptica (DO) e unidade arbitrária (UA) para as diferentes formas clínicas da LTA (tegumentar, mucosa, cutâneamucosa) segundo Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar (BRASIL, 2017), no intuito da descrição e comparação de como se comporta em cada uma delas.

5.4.4 Descrição das características clínicas das lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana frente a resposta sorológica do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis*

Foi realizado ainda, uma descrição de parâmetros ligados diretamente as características clínicas das lesões de LTA, as variáveis consideradas foram: presença de lesões cutâneas (presença de lesão, ausência de lesão, ignorado, presença de lesões múltiplas) e a presença de lesões associadas (lesões ignoradas, lesões ausentes, linfadenopatia, presença de nódulos subcutâneos no trajeto linfático, adenite regional, adenite generalizada, adenite local não relacionada, eritema nodoso, eritema multiforme, edema localizado). Observou-se também as respostas sorológicas (DO e UA) frente ao ELISA *in house* para LTA dos pacientes com essas características de lesão.

5.5 PROTOCOLO DE ATENDIMENTO E DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM SUSPEITA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATENDIDOS NO LAPCLINVIGILEISH NO PERÍODO DE 2000 A 2005

No ambulatório o paciente com suspeita de LTA foi avaliado por médicos, dermatologistas (lesões de pele) ou otorrinolaringologistas (no caso de lesão mucosa) além da equipe de enfermagem especializada. Foram colhidos dados epidemiológicos, o histórico dos pacientes e realizado o exame clínico. Em caso de lesão sugestiva em mucosa ou pele foi realizada a biópsia do fragmento da lesão que era encaminhado para realização de exames

laboratoriais. O paciente ainda foi encaminhado para coleta de sangue para realização de exames laboratoriais específicos, no intuito de acompanhar o caso clínico e conseqüentemente o tratamento, para os agravos diagnosticados. Além disso, o soro foi encaminhado para realização do ELISA *in house* para o imunodiagnóstico para LTA. A biópsia da lesão foi fragmentada e direcionada para o diagnóstico laboratorial onde foram realizadas as seguintes técnicas, específicas para o diagnóstico da LTA:

1) Exame direto / imprints: Os fragmentos da lesão após a coleta foram submetidos a compressão em lâmina de vidro específica e submetida a secagem ao ambiente e em seguida foi fixada com álcool metílico de 3-5 minutos e submetida a secagem ao ambiente. A coloração foi realizada utilizando corante Giemsa por 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente e secagem ao ambiente. A leitura foi realizada em microscópio ótico em objetiva de 1000x (OPAS, 2021)

2) Cultivo *in vitro* para *Leishmania* spp.: Os fragmentos foram acondicionados em salina estéril contendo antibióticos e antifúngico durante vinte quatro horas a 4°C (De Mello *et al.*, 2010). Após esse período os fragmentos foram cortados e semeados separadamente em 3 tubos contendo meio de cultura bifásico NNN acrescido de meio Schneider's Insect Medium® suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubados em estufa BOD sob temperatura de 26-28°C durante trinta dias. As culturas foram avaliadas semanalmente para observação das formas promastigotas. A partir da presença de parasitos, quando possível, procedeu-se à produção de massa parasitária para posterior identificação etiológica. Essa etapa foi feita através de eletroforese de isoenzimas (multilocus enzyme electrophoresis - MLEE) de acordo com protocolos já definidos na literatura (Cupolillo *et al.*, 1997).

3) Histopatologia: Os fragmentos de biópsia foram fixados em formol os cortes histológicos foram parafinados e processados utilizando a coloração de hematoxilina-eosina. A quantificação microscópica dos parasitos e a análise das características histopatológicas da doença foi avaliada por microscopia óptica utilizando aumento de 40x e 100x (Gontijo; Carvalho, 2003).

4) ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis*: Para sua realização, foram utilizadas placas de poliestireno sensibilizadas com antígeno bruto de *Leishmania (Viannia) brasiliensis* obtido conforme o protocolo de Ribeiro *et al.* (2007). O antígeno bruto do parasito foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 em concentração previamente definida por

titulação e distribuído em volume de 100 µL por poço na placa, seguido de incubação em câmara úmida durante 2 horas a 37°C (± 1) na estufa ou a 4°C na geladeira por 16 a 24 horas. Após a sensibilização, a placa foi submetida a 4 lavagens com solução de lavagem (com PBS 0,01M pH 7,2 com 0,05% de Tween 20) num volume de 300µL por poço. As amostras de soro foram diluídas em PBS T-Leite (solução de caseína a 1% em PBS 0,01M pH 7,2 com 0,05% Tween 20) numa diluição de 1:40 e aplicadas num volume de 100 µL por poço, com posterior incubação a 37° C (± 1) em ambiente úmido por 45 minutos. Após a incubação a placa foi submetida a 4 lavagens com solução de lavagem num volume de 300µL por poço. O conjugado (Anti IgG humana conjugada a peroxidase) foi diluído, conforme a diluição de trabalho no momento da utilização, em PBS T -Leite e distribuída na placa no volume de 100 µL por poço, em seguida, a placa foi submetida a incubação em 37° C (± 1) em ambiente úmido por 45 minutos. Após a incubação, foram realizadas 4 lavagens com solução de lavagem com volume de 300 µL por poço. Para revelação, foi utilizada solução de TMB (Tetrametilbenzidina), num volume de 100 µL por poço por 30 minutos ao abrigo da luz. A reação de revelação foi bloqueada com 50 µL de ácido sulfúrico 1N. A leitura foi obtida através da medição das absorbâncias em leitora de microplacas com filtro de medida de 450nm, sem o filtro de referência.

O ponto de corte foi determinado através da média das absorbâncias dos soros negativos mais duas vezes o desvio padrão da densidade óptica destes soros. O resultado foi expresso em Unidade Arbitrária Arbitrada (UA) que corresponde a razão entre a leitura de Absorbância da amostra e o ponto de corte do teste no ato da realização. As amostras consideradas positivas (reatoras) foram as com resultado em unidade arbitrada superior a 1,2 (mais que 20% do valor da linha de corte) e as amostras consideradas negativas (não reatoras) foram aquelas com UA inferior a 1.0. Para as amostras indeterminadas os valores de UA considerados foram entre 1.0 e 1,2.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública - CEP/Ensp e aprovado com o número 6.078.906 (Anexo A). O projeto também foi submetido ao Comitê de Ética do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas-CEP/INI (instituição coparticipante) e aprovado com o número 6.124.576 (Anexo B).

Todos os procedimentos éticos relativos aos participantes da pesquisa foram garantidos. Foi solicitada a dispensa de obtenção de um Termo de Consentimento Livre e

Esclarecido (TCLE), tendo como justificativa principal a utilização nesta pesquisa somente de dados já coletados anteriormente, não sendo utilizada coleta de novos dados ou amostras clínicas. Outras justificativas relativas ao pedido da dispensa estão descritas no documento específico no Apêndice A. O pesquisador, após aprovação do Comitê de Ética, assinou um Termo de Compromisso para Uso de Dados (TCUD) conforme Apêndice B junto à instituição coparticipante.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a observação de resultados pela forma descritiva dos valores das variáveis de interesse, observando-se valores máximos e mínimos, porcentagens e as médias. O primeiro passo consistiu na realização de uma avaliação de normalidade do banco de dados. O teste de normalidade é uma etapa fundamental para determinar se os dados coletados seguem uma distribuição normal, o que é uma suposição frequentemente necessária para a aplicação de muitos métodos estatísticos paramétricos. Métodos como o teste de Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e Anderson-Darling são comumente usados para avaliar a normalidade dos dados (Conover, 1999).

Para este trabalho adotou-se o Teste de Shapiro-Wilk como teste padrão para avaliação da normalidade do banco de dados através do uso do Software Jamovi (Versão 2.3.28, 2023). O teste de Shapiro-Wilk é um dos testes mais conhecidos para verificar a normalidade dos dados. Ele calcula uma estatística de teste que é detectada a uma distribuição teórica para determinar se os dados seguem uma distribuição normal (Conover, 1999).

Para comparação entre as variáveis foi utilizado o teste de Kruskal Wallis já que para esta avaliação o teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk demonstrou que esses dados não seguem uma distribuição normal. A análise da correspondência entre os ELISA *in house* e os testes parasitológicos foram realizadas através da análise da concordância e da análise do Kappa Cohen's. Foi realizada teste de comparações múltiplas das diferentes formas clínicas de LTA em relação as medidas de DO e UA utilizando o teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Todas as análises foram realizadas utilizando Software Jamovi (Versão 2.3.28, 2023).

6 RESULTADOS

6.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO E DOS TESTES UTILIZADOS NO DIAGNÓSTICO DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA REALIZADOS NO PERÍODO DE ESTUDO.

No período avaliado, um total de 233 pacientes foram atendidos e submetidos ao ELISA *in house* em apoio ao diagnóstico da LTA no período de 2000 a 2005 (conforme descrito em um dos critérios de inclusão do trabalho). Desses pacientes selecionados, 219 apresentaram diagnóstico de LTA confirmado por meio de algum teste parasitológico e 14 pacientes obtiveram diagnóstico clínico, dentre esses, 11 pacientes não apresentaram nenhuma positividade nas técnicas parasitológicas realizadas. De acordo com o protocolo de atendimento do LapClinVigiLeish para o diagnóstico de LTA (item 5.5 da metodologia), foram realizados exames parasitológicos (cultura *in vitro*, exame direto/*imprint* e histopatológico) em 230 pacientes, e em 3 pacientes não foi possível a realização de nenhum exame parasitológico.

A distribuição por ano (2000 a 2005) dos atendimentos/exames parasitológicos e sorológicos realizados para o diagnóstico da LTA foi demonstrada na tabela 2. Ao longo de todo período de estudo (2000 a 2005) em que foram atendidos 233 pacientes com LTA, 53,6% (125/233) dos pacientes realizaram cultivos *in vitro*, 77,7% (181/233) dos pacientes realizaram exames diretos/*imprint* e 92,3% (215/233) dos pacientes realizaram exames histopatológicos (Tabela 2).

O ano que mais pacientes foram atendidos e exames realizados foi o ano de 2003, com 65 pacientes com LTA, sendo realizados 32 cultivos *in vitro*, 54 exames diretos, 60 histopatológicos; seguido do ano de 2002 em que foram atendidos 52 pacientes com LTA, realizados 44 cultivos *in vitro*, 41 exames diretos, 48 histopatológicos; após o ano de 2005 em que foram atendidos 46 pacientes com LTA e realizados 12 cultivos *in vitro*, 43 exames diretos, 43 histopatológicos foram realizados, em 2004 foram atendidos 38 pacientes com LTA e realizados 12 cultivos *in vitro*, 29 exames diretos, 34 histopatológicos; em 2000 foram atendidos 21 pacientes com LTA, realizados 16 cultivos *in vitro*, 8 exames diretos, 20 histopatológicos; e o ano de 2001 foi o que menos houve atendimentos e consequentemente exames para o diagnóstico de LTA, sendo atendidos 11 pacientes com LTA, realizados 9 cultivos *in vitro*, 6 exames diretos, 10 histopatológicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição por ano durante o período de estudo (2000 a 2005) do número de pacientes com LTA atendidos, ensaios de ELISA *in house*, isolamento *in vitro*, exame direto/*imprint* e histopatológico realizados.

Anos	Nº pacientes atendidos	ELISA <i>in house</i>	Cultivo <i>in vitro</i>	Exame direto/ <i>imprint</i>	Histopatologia
2000	21	21	16	8	20
2001	11	11	9	6	10
2002	52	52	44	41	48
2003	65	65	32	54	60
2004	38	38	12	29	34
2005	46	46	12	43	43
Total/ano	233	233	125	181	215

Fonte: O próprio autor.

É importante destacar que dentre as técnicas parasitológicas utilizadas a histopatologia foi a mais realizada em todos os anos de estudo, exceto no ano de 2005 em que o número de exames diretos realizados se igualou a histopatologia (N=43). O Exame direto foi a segunda técnica parasitológica a ser mais utilizada, exceto nos anos de 2000 (N=16), 2001 (N=9) e 2002 (N=44) em que o cultivo *in vitro* foi mais realizado que o exame direto.

Como o um dos critérios de inclusão neste estudo foi a realização do ELISA *in house* no primeiro atendimento, o número de pacientes atendidos corresponde exatamente ao número de ensaios de ELISA *in house* realizados (n=233) (tabela 2). Em relação a distribuição por ano de ensaios de ELISA *in house*, foram realizados 21 ensaios em 2000, 11 ensaios em 2001, 52 em 2002, 65 em 2003, 38 em 2004 e 46 em 2005. Podendo-se observar que o ELISA *in house* foi a técnica mais utilizada em comparação as técnicas parasitológicas neste estudo em apoio ao diagnóstico da LTA. Do total de ensaios de ELISA *in house* realizados de 2000 a 2005, 85,4% (199/233) dos pacientes apresentaram resultados positivos e 14,6% (34/233) dos pacientes apresentaram resultado não reagente (negativo).

O ensaio de ELISA *in house* apresentou uma maior positividade 85,4% (199/233) quando comparado com o cultivo *in vitro* 59,2 % (74/125) e o exame direto/*imprint* 44,2% (80/181). Entretanto, a positividade na histopatologia apresentou em maior proporção 87,4 % (188/215) quando comparada ao ELISA *in house* (Tabela 3) e aos outros ensaios parasitológicos realizados. Entretanto, quando se avalia a presença de algum resultado positivo levando-se em consideração os testes parasitológicos realizados nos pacientes foi

observado um maior percentual de resultados positivos 94% (219/233) quando comparado com a positividade do ELISA *in house* 85,4% (199/233).

A tabela 3 demonstra positividade de 94% (219/233) nos diferentes testes parasitológicos (parasitológico geral) realizados nos pacientes. Durante o protocolo de atendimento do LApClinVigiLeish para o diagnóstico de LTA, 4,7% (11/233) dos pacientes apresentaram resultados parasitológicos negativos e em 1,3% (3/233) dos pacientes não foi possível a realização nenhum teste parasitológico.

A técnica parasitológica mais realizada para o diagnóstico da LTA foi a histopatologia (92,3%- 215/233) seguido do exame direto/*imprint* (77,7%- 181/233) e cultivo *in vitro* (53,6%- 125/233). O maior percentual de resultados parasitológicos negativos, foi apresentado pelo exame direto/*imprint* (55,8% - 101/181), seguido pelo cultivo *in vitro* (38,4%- 48/125) e a histopatologia (12,5%- 27/215). O cultivo *in vitro* demonstrou uma taxa de maior de exames não realizados quando comprado aos outros ensaios (46,3% - 108/233).

Tabela 3 - Apresentação dos resultados percentuais das diferentes técnicas diagnósticas realizadas no período de 2000 a 2005 em pacientes (N=233) com LTA.

Técnicas Diagnósticas	Resultados			Quantitativo das Técnicas	
	Positivos	Negativos	Contamina dos	Realizadas	Não Realizadas
ELISA <i>in house</i>	85,4%(199/233)	14,6%(34/233)	NA	100%(233/233)	NA
Cultivo <i>in vitro</i>	59,2%(74/125)	38,4%(48/125)	2,4%(3/125)	53,6%(125/233)	46,4%(108/233)
Exame direto/ <i>Imprint</i>	44,2%(80/181)	55,8%(101/181)	NA	77,7%(181/233)	22,3%(52/233)
Histopatologia	87,4%(188/215)	12,5%(27/215)	NA	92,3%(215/233)	7,7%(18/233)
Parasitológico geral *	94%(219/233)	4,7%(11/233)	NA	98,7%(230/233)	1,3%(3/233)

Legenda: NA (não se aplica), * presença de algum dos testes parasitológicos realizados com resultados positivos ou negativos (com ou sem presença de amastigotas/promastigotas).

Fonte: O próprio autor.

Dos pacientes com resultados reagentes no ELISA *in house* (N=199), 94% (187/199) apresentaram presença de amastigotas/promastigotas (teste positivo) em algumas das técnicas parasitológicas realizadas. Somente 5% (10/199) pacientes com sorologia positiva pelo ELISA *in house* não apresentaram presença de amastigotas/promastigotas (teste negativo) em alguma técnica parasitológica realizada. A técnica de histopatologia foi a que mais detectou a presença de amastigotas dentre os pacientes (N=162) reagentes no ELISA *in house* (tabela 4). Dos pacientes não reagentes no ELISA *in house* (N=34), 94% (32/34) apresentaram presença

de amastigotas/promastigotas (positivo) em algumas das técnicas parasitológicas realizadas. Somente 2,9% (1/34) dos não reagentes pelo ELISA *in house* não apresentaram presença de amastigotas/promastigotas (teste negativo) em alguma técnica parasitológica realizada. A técnica de histopatologia também foi a que mais detectou a presença de amastigotas dentre os pacientes (N=26) com sorologia negativa no ELISA *in house* (Tabela 5).

Tabela 4 - Resultados de ELISA *in house* reagentes (positivos) e a relação com os resultados nos testes parasitológicos realizados para o diagnóstico da LTA.

Exames Parasitológicos	RESULTADOS DE ELISA <i>in house</i> REAGENTES (N=199)			
	Positivos	Negativos	Não realizados	Contaminados
Cultivo <i>in vitro</i>	61	41	94	3
Exame direto/ <i>Imprint</i>	69	87	43	NA
Histopatologia	162	24	13	NA

Legenda: NA (não se aplica), * presença de algum dos testes parasitológicos realizados com resultados positivos ou negativos (com ou sem presença de amastigotas/promastigotas).

Fonte: o próprio autor.

Os pacientes com ELISA *in house* reagente (N=199) demonstram uma DO que variou de 0,053 a 1,410 com média de 0,379 e uma UA variando de 0,8 a 9,0, com média de 2,3. Os pacientes que apresentaram ELISA *in house* não reagentes (N=34) apresentaram DO que variou entre 0,030 a 0,226, com média de 0,126 e valores de UA que variaram de 0,2 a 1,0, com média de valores de 0,7. Foi possível através dos resultados de ELISA *in house* tanto utilizando a DO como os valores de UA, separar os pacientes sem dificuldades entre os diferentes resultados de pacientes reagentes e não reagentes, as medidas entre os valores negativos e positivos apresentaram adequada diferenciação. Diante da observação dos resultados, pôde-se constatar que 187 resultados reagentes no ELISA *in house* foram confirmados pelas técnicas parasitológicas e 10 resultados reagentes no ELISA *in house* não foram confirmados nos exames parasitológicos. Somente um resultado não reagente no ELISA *in house* foi confirmado com resultados negativos nos exames parasitológicos, e 32 resultados não reagentes no ELISA *in house*, não foram confirmados, apresentando positividade nos exames parasitológicos (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5 - Resultados de ELISA não reagentes (negativos) e a relação com os resultados nos testes parasitológicos realizados no diagnóstico da LTA.

RESULTADOS DE ELISA <i>in house</i> NÃO REAGENTES (N=34)			
Exames Parasitológicos	Positivos	Negativos	Não realizados
Cultivo <i>in vitro</i>	13	7	14
Exame direto/ <i>Imprint</i>	11	14	9
Histopatologia	26	3	5
Parasitológico geral *	32	1	1

Legenda: *presença de algum dos testes parasitológicos realizados com resultados positivos ou negativos (com ou sem presença de amastigotas/promastigotas).

Fonte: o próprio autor.

6.2 DESCRIÇÃO DAS RESPOSTAS SOROLÓGICAS NO ELISA *IN HOUSE* COM ANTÍGENO *L. (V.) BRASILIENSIS* DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM SUAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DURANTE O PERÍODO DE ESTUDO

Nesse grupo de pacientes com LTA (N=233) selecionados para esse estudo, foram diagnosticadas 3 diferentes formas clínicas da doença: a leishmaniose tegumentar (LT) com lesões restritas a pele, a leishmaniose mucosa (LM) com lesões restritas a mucosas e leishmaniose cutaneomucosa (LCM) com lesões presentes em pele e mucosas.

Ao longo do período estudado foram encontrados na maioria dos pacientes (N=180) os casos de LT, 24 casos de LM e 29 casos de LCM. Para os casos de LT (N=180) as densidades ópticas variaram de 0,053 a 1,326, com uma média de DO de 0,333, os valores de UA variaram de 0,4 a 6,9 com média de UA de 2,0. Nesse grupo de pacientes foram encontrados 84,4% (152/180) resultados reagentes (positivos) no ELISA *in house* e 15,6% (28/180) resultados não reagentes (negativos). Para os casos de LM (N=24) as densidades ópticas variaram de 0,050 a 1,410, com média de 0,395 e os valores de UA variaram de 0,5 a 9,0, com média de 2,6. Foram encontrados 92% (22/24) de resultados reagentes no ELISA *in house* e 8% (2/24) de resultados não reagentes (negativos). Para os casos de LCM (N=29) as densidades ópticas variaram de 0,030 a 1,097, com média de 0,353 e os valores de UA variaram de 0,2 a 6,0, com média de 2,2. Foram encontrados 86,2% (25/29) de resultados reagentes no ELISA *in house* e 13,8% (4/29) de resultados não reagentes (negativos).

Figura 5A - Distribuição dos valores de densidade óptica das formas clínicas avaliadas.

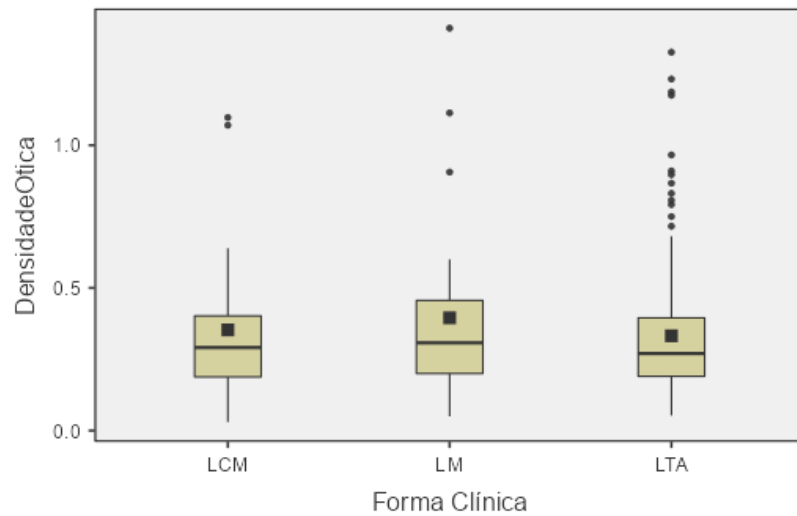
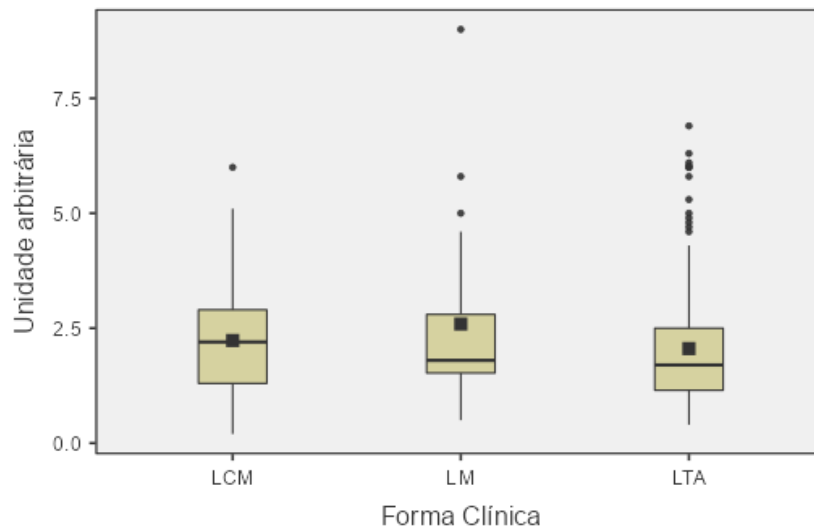


Figura 5B - Distribuição das medidas de unidade arbitrária das formas clínicas avaliadas



Legenda:

(leishmaniose tegumentar), LM (leishmaniose mucosa), LCM (Leishmaniose cutâneo-mucosa).

Fonte: o próprio autor.

LTA

As diferentes formas clínicas não apresentaram diferenças significativas nem nas medidas de DO nem nos valores de UA as médias para as duas medidas apresentaram valores muito próximos (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) somente foi observado um leve aumento de valores de DO e UA em LM quando comparados aos outros grupos, entretanto, esse aumento observado não foi significativo (Kruskal-Wallis, $p > 0,05$) (Figura 5A e Figura 5B). Para esse grupo de pacientes, durante o período de estudo descrito (2000 a 2005) não foi possível

diferenciar a partir dos resultados pela realização do ELISA *in house* (através das medidas de DO e UA) diferença entre as diferentes formas clínicas de LTA (LT, LM e LCM).

Para avaliar os grupos das três diferentes formas clínicas levando em consideração as medidas de DO e os valores de UA foi utilizada também a comparação múltipla de grupos independentes. Com esta análise foi possível também observar maiores valores de DO e UA no grupo de pacientes com LM tanto em relação ao grupo de pacientes com LCM ($W_{do}=0,320$ / $W_{ua}=0,226$) quanto com o grupo de LT, em que essa diferença com o grupo e LM foi maior ($W_{do}= - 0,813$ / $W_{ua}= - 1,778$), entretanto mesmo isso sendo observado, essas diferenças não foram significantes (Dwass-Steel-Critchlow-Fligner, $p >0,05$).

6.3 DESCRIÇÃO DAS RESPOSTAS SOROLÓGICAS NO ELISA *IN HOUSE* COM ANTÍGENO *L. (V.) BRASILIENSIS* DOS PACIENTES COM PRESENÇA DE LESÕES CUTÂNEAS E LESÕES ASSOCIADAS DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DURANTE O PERÍODO DE ESTUDO

A presença de lesões cutâneas nos pacientes com LTA (variáveis= presença de lesão, ausência de lesão, ignorado, presença de lesões múltiplas) foi observada em 95,3% (222/233) dos pacientes atendidos. Ao considerar os pacientes com lesões, observou-se que 85,1% (189/222) apresentaram resultados de ELISA *in house* reator (positivo) e 14,9% (33/222) desses pacientes com ELISA *in house* não reator (negativo). As médias de DO dos pacientes com ELISA *in house* reagente e com presença de lesões cutâneas foi 0,374 com DO variando de 0,053 a 1.326. As médias dos valores de UA dos pacientes com ELISA *in house* reagente e com presença de lesões cutâneas foi de 2,3 com medidas variando de 0,8 a 6,9. Observou-se maiores valores de média de DO e UA em indivíduos sem lesões cutâneas (somente com presença de lesões mucosas). Os pacientes com múltiplas lesões apresentaram menor valor da média de DO e UA, entretanto, essas diferenças não foram significativas (Kruskal-wallis, $p >0,05$).

A presença de lesões associadas (variáveis analisadas= lesões ignoradas, lesões ausentes, linfadenopatia, presença de nódulos subcutâneos no trajeto linfático, adenite regional, adenite generalizada, adenite local não relacionada, eritema nodoso, eritema multiforme, edema localizado) nos pacientes com LTA foi observada em 31,7% (74/233) dos pacientes atendidos, dentre eles, 83,8% (62/74) apresentaram resultados de ELISA *in house* reator (positivo) e 16,2% (12/74) desses pacientes com ELISA *in house* não reator (negativo). As médias de DO dos pacientes com ELISA *in house* positivo e com presença de lesões

associadas foi 0,311 com variação de 0,030 a 1,187, já as médias dos valores de UA foi de 1,9 com medidas variando de 0,2 a 6,1. Em relação ao comportamento de DO e UA frente a presença de leões associadas na LTA não foi observada diferença significativa desses parâmetros para os pacientes com presença de alguma dessas lesões associadas de pacientes sem presença de lesões associadas (Kruskal-wallis, $p > 0,05$).

6.4 AVALIAÇÃO DA CONCORDÂNCIA DO ELISA *IN HOUSE* COM ANTÍGENO DE *L. (V.) BRASILIENSIS* COM OS TESTES PARASITOLÓGICOS REALIZADOS NO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO PERÍODO DE ESTUDO

A concordância do teste de ELISA *in house* com os testes parasitológicos foi demonstrada na tabela 6. O ELISA *in house* apresentou 56% de correspondência com o cultivo *in vitro*, 52% de correspondência com exame direto/*imprint*, 77% de correspondência com a histopatologia e 82% de concordância entre o ELISA *in house* a o parasitológico geral (presença de algum exame parasitológico positivo, com presença de amastigotas/promastigotas). Apesar da concordância do ELISA *in house* x histopatologia e ELISA *in house* x parasitológico geral apresentarem uma concordância elevada (77% e 82% respectivamente), os índices Kappa não foram considerados adequados, demonstrando pouca correspondência entre todas as avaliações realizadas, sem a presença de significância entre as análises realizadas (Kappa Cohen's, $p > 0,05$). Esses resultados mostram que apesar a concordância existente entre o ELISA *in house* e alguns testes parasitológicos essa relação não foi adequada neste estudo (tabela 6).

Tabela 6 - Concordância do ELISA *in house* com os testes diagnósticos para LTA (Cultivo *in vitro*, Exame direto/*Imprint*, histopatologia e parasitológico geral).

Composição das Análises	Concordância (%)	Índice Kappa	p (valor)
Cultivo <i>in vitro</i> X ELISA	56%	-0,0332	$p > 0,05$
Exame direto/ <i>Imprint</i> X ELISA	52%	0,0156	$p > 0,05$
Histopatologia X ELISA	77%	-0,0264	$p > 0,05$
Parasitológico geral* X ELISA	82%	-0,0283	$p > 0,05$

Legenda: *presença de algum dos testes parasitológicos realizados com resultados positivos ou negativos (com ou sem presença de amastigotas/promastigotas).

Fonte: O próprio autor.

7 DISCUSSÃO

A LTA é um grave problema de saúde pública no Brasil e em especial na América do Sul. O estado do Rio de Janeiro é endêmico para a doença e apresenta um elevado número de casos nos últimos anos com maior concentração dos casos na Região Metropolitana I (Tabela 01). Mais de 20% dos municípios são de grande importância epidemiológica para a ocorrência da LTA no estado (Soares *et al.*, 2020).

A detecção precoce e precisa da infecção é crucial para o tratamento eficaz e o controle da disseminação da doença. Dentre os métodos diagnósticos têm-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) que tem sido amplamente utilizado para a detecção específica contra anticorpos do parasito, enquanto os testes parasitológicos, como o cultivo *in vitro*, histopatologia e exame direto por impressão (*imprint*), são utilizados para identificar diretamente os parasitas em tecidos ou amostras clínicas (OPAS, 2019). O ELISA tem sido objeto de diversas pesquisas que buscam avaliar o desempenho, sensibilidade, especificidade e sua capacidade no diagnóstico da LTA (Bracamonte *et al.*, 2020; Mendes *et al.*, 2019; Pena *et al.*, 2020; Sato, 2017; Silva, 2023; Zanetti *et al.*, 2019). O diagnóstico sorológico ainda é pouco utilizado nos estabelecimentos públicos de saúde, têm suscitado perguntas de pesquisa e estimulado novas avaliações para a adoção desse método diagnóstico na prática clínica (Zanetti *et al.*, 2019; Mendes *et al.*, 2019).

O ELISA tem a vantagem de ser uma técnica sensível e específica na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* spp. Isso permite a identificação de transmissão passada e/ou atual, mesmo em alcance inicial da doença, quando os parasitos podem não ser detectados facilmente nos testes parasitológicos (Ferreira; Moraes, 2013).

O ELISA pode ser aplicado em estudos epidemiológicos em larga escala para identificar áreas endêmicas, determinar a prevalência da infecção e avaliar o sucesso das estratégias de controle, podendo ainda ser útil para a identificação de casos assintomáticos, nos quais os parasitos podem estar presentes em níveis baixos, dificultando a detecção por métodos parasitológicos (CONFORT, 2009).

A concordância entre diferentes métodos de diagnóstico sugere a segurança de empregar o ELISA com antígeno homólogo para o diagnóstico da LTA. Ao comparar os resultados de dois ou mais testes diferentes, podemos ter mais certeza de que o diagnóstico é preciso e confiável. A LTA é uma doença com sintomatologia não exclusiva, ou seja, é necessário o diagnóstico diferencial para várias outras doenças. A precisão ou o

conhecimento da capacidade diagnóstica de um teste é crucial para a tomada de decisões clínicas adequadas (Bracamonte *et al.*, 2020; CONFORT, 2009).

A avaliação da precisão de testes diagnósticos contribui significativamente para a redução de falsos positivos e falsos negativos. A sensibilidade e especificidade, quando apuradas permitem uma combinação mais específica de métodos diagnósticos e contribui diretamente para uma melhor detecção dos verdadeiros positivos. E por fim e não menos importante é a relevância da decisão clínica ser adequada e assegurar a prevenção quaternária para o paciente (De Oliveira Duque *et al.*, 2019).

Segundo Zanetti *et al.* (2019), para o diagnóstico da LTA geralmente é necessária a combinação de diferentes métodos diagnósticos para obtenção de resultados mais precisos. Nesta dinâmica, neste trabalho a utilização do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) braziliensis* demonstra ser uma boa opção, a positividade elevada (85,4%) nos pacientes com LTA corroboram com outros trabalhos que também encontraram valores próximos ou superior a este, demonstrando a capacidade de detecção do ELISA para anticorpos anti-*Leishmania* spp. (Bracamonte *et al.*, 2020; Ferreira *et al.*, 2006; Pena *et al.*, 2020). É importante destacar ainda que 94% dos pacientes que apresentaram reação positiva no ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) braziliensis* também apresentaram presença de amastigotas em algumas das técnicas parasitológicas realizadas. Sendo a histopatologia a técnica que mais identificou a presença de amastigotas dentre os pacientes reatores no ELISA.

Quando foi realizada a comparação dos resultados do ELISA *in house* com os testes parasitológicos realizados segundo protocolo diagnóstico do LapClinVigiLeish, pôde ser observada uma correlação com valor elevado (82%) com todos os testes parasitológicos realizados, 56% com o cultivo *in vitro*, de 77% com a histopatologia e de 52% com o exame direto/*imprint*. Entretanto, essa concordância não foi adequada em valores de Kappa (Kappa Cohen's, $p > 0,05$), já que foram demonstrados valores até negativos (Tabela 5). Ao observar os resultados encontrados por Confort (2009), encontrou-se semelhança aos deste estudo. Ao avaliarem a concordância do ELISA *in house* com resultados da histopatologia com a cultura *in vitro* e exame direto/*imprint* foram encontradas concordâncias de 63,9%, 76% e 49,3% respectivamente, valores um pouco menores quando comparados aos resultados demonstrados para o estudo atual. Entretanto, da mesma forma que no estudo atual, não foram encontradas diferenças significantes na correlação entre esses valores.

Diante desses valores mais altos, e da viabilidade de realização do ELISA no diagnóstico de LTA acredita-se que se justifique sua utilização quando seja possível em conjunto com outros métodos, justificando-se ainda a investigação de forma mais detalhada

dessa correlação de resultados com testes parasitológicos, em análises futuras aumentando o número de pacientes nessas investigações.

É descrito que pacientes com LTA apresentam baixos títulos de anticorpos o que dificulta o diagnóstico sorológico, aumentando as chances de falsos negativos (Manual de LTA do Ministério da Saúde). Para este trabalho, foi observado que no ELISA *in house* uma diferenciação clara entre os resultados positivos (reagentes) e resultados negativos (não reagentes), o que diminui as possibilidades de erros ou dúvidas na interpretação dos resultados. Entretanto, dos pacientes com ELISA negativos (14,6% 34/233), somente 2 (5,88% n:2/34) pacientes apresentaram diagnóstico clínico (sem nenhum exame parasitológico positivo) e 32 (94,1 n:32/34) apresentaram resultados parasitológicos positivos. Observou-se uma porcentagem pequena de falsos negativos apresentados, que foi considerada baixa e que pode ser evitada na detecção do paciente infectado ao se utilizar diferentes técnicas de diagnóstico em conjunto.

O ELISA apresentou positividade de 84% para pacientes com LT, 92% para pacientes com LM e 86,2% para pacientes com LCM. Esses valores se assemelham em outros trabalhos de avaliação da *performance* do ELISA (Barroso Freitas, 2009; Bracamonte *et al.*, 2020; CONFORT *et al.*, 2009).

A forma LM caracteriza-se por apresentar maior índice de positividade e também nos índices de DO e UA de forma isolada. Sabe-se que na forma LM há uma elevação dos níveis de anticorpos quando comparada à forma cutânea (BRASIL, 2017). Observou-se maiores valores de DO e UA no grupo de pacientes com LM em relação ao grupo de pacientes com LCM ($W_{do}=0,320$ / $W_{ua}=0,226$) e principalmente com o grupo de LT, em que essa diferença com o grupo e LM foi maior ($W_{do}= - 0,813$ / $W_{ua}= - 1,778$). Porém essas diferenças não foram significantes (Dwass-Steel-Critchlow-Fligner, $p >0,05$) e corroboram os achados de Barroso Freitas, 2009 e Confort, 2009. No estudo de De Carvalho *et al.* (2022), também não foi possível detectar diferenças significantes entre as diferentes formas clínicas de LTA, demonstrando que o ELISA isoladamente não foi capaz de determinar as diferentes manifestações clínicas. Sugerindo que não é uma boa ideia olhar somente o resultado do ELISA de forma isolada, mas sim a correlação com outros fatores como a epidemiologia, a clínica e a carga parasitária (De Carvalho *et al.*, 2022)

Neste trabalho não foi possível observar diferenças entre os pacientes com presença de lesões cutâneas e lesões associadas ao quadro de LTA utilizando os resultados de DO e UA do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis*, não sendo esta, uma boa ferramenta de forma isolada para diferenciar essas características. Os pacientes sem lesões cutâneas

(leishmaniose mucosa) apresentaram maiores valores de DO e UA quando comparados a pacientes com presença de lesões ou com lesões múltiplas (que apresentaram menores valores de DO e UA), entretanto, essas diferenças não foram significantes (Kruskal-wallis, $p > 0,05$). CONFORT (2009) observou fracas correlações positivas entre a positividade dos valores de UA em relação a características das lesões (diâmetro das lesões e número de lesões) de pacientes com LTA.

Ao avaliar o desempenho do ELISA em uma revisão sistemática (n:38) Pena *et al.* (2020) identificaram que o ELISA como método diagnóstico possui boa acurácia na meta análises ³e baixa heterogeneidade⁴. O autor ainda discute que o ELISA é útil para triagem devido à prevalência da LTA. Entretanto apresenta como limitação a capacidade de detecção da doença na fase inicial. O ELISA com seu desempenho diagnóstico torna-se uma boa opção para estudos de soroprevalência, monitoramento de tratamentos da LTA e para o *design* de antígenos definidos em estudos posteriores. O ELISA pode apresentar limitações para o diagnóstico diferenciado em áreas endêmicas para doença de Chagas em razão da proximidade filogenética entre os parasitas (Bracamonte *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2021).

Mesmo sendo ainda considerado de uso limitado para o diagnóstico isolado da LTA o ELISA pode ser utilizado em apoio ao exame físico e a outros exames disponíveis, pois é uma técnica minimamente invasiva, que utiliza sangue total como amostra clínica, de mais fácil transporte quando existe a necessidade (Gomes *et al.*, 2014). Seu uso ainda se justifica pela complexidade do diagnóstico LTA e pelo perfil de toxicidade do tratamento disponível para a doença (Gomes *et al.*, 2014). E diante dos resultados demonstrados em nosso estudo, a utilização do ELISA como técnica de apoio ao diagnóstico da LTA de ser realizada quando possível, sendo importante ainda a continuação da utilização do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* em novos estudos diagnósticos na LTA.

³ Meta análises: método estatístico para agregar os resultados de dois ou mais estudos independentes, sobre uma mesma questão de pesquisa, combinando seus resultados em uma medida sumária.

⁴ Baixa Heterogeneidade.

8 CONCLUSÃO

- O ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* demonstrou uma maior positividade (85,4%) quando comparado ao cultivo *in vitro* (59,2 %) e ao exame direto/*imprint* (44,2%), entretanto, demonstrou uma menor positividade quando comparado a histopatologia (87,4%) aos exames parasitológicos gerais (94%) para o diagnóstico dos pacientes com LTA;
- O ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* demonstrou uma concordância de resultados de 82% quando se levou em consideração todos os testes parasitológicos utilizados neste estudo. De forma individual o ELISA *in house* demonstrou uma concordância de 56% com o cultivo *in vitro*, de 77% com a histopatologia e de 52% com o exame direto/*imprint*. Entretanto, não foi possível observar uma concordância adequada entre os resultados do ELISA *in house* com os resultados dos testes parasitológicos utilizados no diagnóstico dos pacientes com LTA (Kappa Cohen's, $p > 0,05$). O ELISA apresentou desempenho satisfatório, tão quanto, os testes parasitológicos o que permite compreender ser este um teste importante e com boa especificidade para ser adotado no diagnóstico da LTA;
- Não foi possível diferenciar através do resultado de DO e UA do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* pacientes com Leishmaniose Tegumentar, Leishmaniose Mucosa e Leishmaniose Cutâneomucosa;
- Foi possível observar maiores valores das médias de DO e UA nos pacientes com Leishmaniose Mucosa, quando comparados aos pacientes com Leishmaniose tegumentar e Leishmaniose cutâneomucosa, entretanto, essas diferenças não foram significantes (Kruskal-wallis, $p > 0,05$);
- Foi possível observar maiores valores das médias da DO e UA em pacientes sem presença de lesões cutâneas (leishmaniose mucosa) quando comparados aos pacientes com presença de lesões e o menor valor de médias de DO e UA em pacientes com lesões múltiplas, entretanto, essas diferenças não foram significantes (Kruskal-wallis, $p > 0,05$);
- Utilizando o ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* não foi possível observar diferenças significantes (Kruskal-wallis, $p > 0,05$) entre as leituras de DO e valores de UA dos pacientes com LTA com presença de lesões associadas em comparação aos pacientes com LTA que não apresentavam lesões associadas ao quadro clínico;

- A utilização do ELISA *in house* com antígeno de *L. (V.) brasiliensis* demonstrou nesse estudo ter um desempenho adequado quando utilizado em apoio no diagnóstico dos pacientes com LTA atendidos no ambulatório do LapClinVigiLeish no período de 2000 a 2005. Espera-se que novas pesquisas deem seguimento a este estudo com novos períodos sendo avaliados;

REFERÊNCIAS

- AMARO, R. R.; COSTA, W. A. Transformações socioespaciais no estado do Rio de Janeiro enquanto determinante social da saúde no contexto das leishmanioses. **Hygeia-Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 13, n. 26, p. 198–210, dez. 2017.
- BARRAL-NETTO M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human_ leishmaniasis/cytokines.bahia.br. **Brazilian Journal Medical Biology Res.** v. 31, n. 1, p. 149-55, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100021>.
- 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 Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 4, p. 383-389, 2009.
- BENCHIMOL, J. L.; JOGAS JR., D. G. **Uma história das leishmanioses no Novo Mundo (fins do século XIX aos anos 1960)**. 1a Ed. Rio de Janeiro. Fino Traço. 2020.
- BENCHIMOL, J. L. Leishmaniasis of the New World from a historical and global perspective, from the 1930s to the 1960s. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 27, n. suppl 1, p. 95–122, set. 2020.
- BRACAMONTE, M. E. *et al.* High performance of an enzyme linked immunosorbent assay for American tegumentary leishmaniasis diagnosis with *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes membrane crude antigens. **PLoS One**, v. 15, n. 5, 2020.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica. Normas e Manuais Técnicos**. Brasília, DF, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana: normas e manuais técnicos**. Brasília, DF, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, DF, 2017.
- 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, p.17, mar. 2019.
- CARVALHO, B. M.; DIAS, C. M. G.; RANGEL, E. F. Phlebotomine sand flies (Diptera, Psychodidae) from Rio de Janeiro State, Brazil: species distribution and potential vectors of leishmaniasis. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, p. 77–87, mar. 2014.
- CONCEIÇÃO – SILVA, F., ALVES, C. R. **Leishmanioses no continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. Disponível em: <https://books.scielo.org/id/dgkx2/pdf/conceicao-9788575415689.pdf#page=37>. Acesso em: 17 dez. 2021.
- CONCEIÇÃO-SILVA F., LEITE-SILVA, J. MORGADO, F. N. The Binomial Parasite-Host Immunity in the Healing Process and in Reactivation of Human Tegumentary

Leishmaniasis. **Front Microbiol.** v. 19, n. 9, p. 1308, 2018.

CONFORT, E. M. **Ensaio Imunoenzimático com Antígeno de Leishmania (Viannia) braziliensis no Diagnóstico e Acompanhamento de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2009. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2009.

COSTA, T. F. *et al.* Soroprevalência e detecção de *Trypanosoma cruzi* em cães residentes em área não endêmica para doença de Chagas na Amazônia legal, Brasil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 26, p. 100648, 2021.

CUPOLILLO, E, GRIMALDI, G, Jr., MOMEM, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg.** v. 3. n. 50. p. 296-311, 1994.

CUPOLILLO, E, GRIMALDI, G, Jr., MOMEM, H. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 91, n. 6. p. 617-626, 1997.

DE MELLO, C. X., MADEIRA, M. F. Skin Scraping is the Most Accessible Technique for the Parasitological Diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 5, 2015.

DE OLIVEIRA DUQUE, M. C. *et al.* Comparison between systemic and intralesional meglumine antimoniate therapy in a primary health care unit. **Acta Tropica**, v. 193, p. 176–182, 2019.

FERNANDES, H. J. **Análise da toxicidade relacionada ao uso intralesional de antimoniato de meglumina para tratamento da leishmaniose cutânea localizada.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Minas Gerais, 2019.

FERREIRA, A. W.; MORAES, S. L. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes.** 3. ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

FERREIRA, M. P. *et al.* Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 48, n. 4, p. 215-217, 2006.

GOMES, C. M. *et al.* Complementary exams in the diagnosis of a american tegumentar leishmaniasis. **A. Bras. Dermatol.**, v. 89, n. 5, p. 701-711, 2014.

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

GUREL, M. S. *et al.* Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clin Dermatol.**, v. 38, n. 2, p. 104-151, 2020.

JOGAS, D. G. J. **Leishmaniose Tegumentar Americana em Perspectiva Histórica e Global (1876-1944).** 2019. Tese (Doutorado em História das Ciências e da Saúde). Casa de

Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, 2019.

LIMA, A. C. V. M. R. **Estudo da variabilidade genética de Leishmania (Viannia) braziliensis Vianna, 1911 de diferentes regiões do Brasil.** 2010. Tese (Doutorado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

MADEIRA, M. F. *et al.* Leishmania (Viannia) braziliensis em cães naturalmente infectados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 551-555, 2003.

MANN, S. *et al.* A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Curr Trop Med Rep.**, v. 8, n. 2, p.121-132, 2021.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Cad de Saúde Pública**, v. 10, p. 359-375, 1994.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmanioses em áreas urbanas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 30, p. 162-163, 1997.

MAURER, M. *et al.* Skin mast cells control T cell-dependent host defense in Leishmania major infections. **FASEB Journal**, v. 20, n. 14, p. 2460-7. 2006. DOI: 10.1096/fj.06-5860com.

MEDEIROS, F. A. C. *et al.* Development and Validation of a PCR-ELISA for the Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Infection by Leishmania (Leishmania) infantum. **Journal of Tropical Medicine**, 2017. DOI: 10.1155/2017/7364854.

MENDES, A. P. O. *et al.* American tegumentary leishmaniasis diagnosis using L. (V.) braziliensis fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. **BMC Infectious Diseases**, v.19, p. 1015, nov. 2019.

NEVES, D. P. **Parasitologia humana.** 11a Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, E. R. **Análise do Desenvolvimento Tecnológico para o diagnóstico das leishmanioses da proteção intelectual à disponibilidade comercial.** 2016. Dissertação. (Mestrado em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou. Minas Gerais, 2016.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. *et al.* An old drug and different ways to treat cutaneous leishmaniasis: Intralesional and intramuscular meglumine antimoniate in a reference center, Rio de Janeiro, Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 9, set. 2021.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. *et al.* Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: a historical cohort study. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 559, ago. 2017.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Manual de Procedimientos Para Vigilancia y Control de Las Leishmaniasis en las Américas.** Washington, D.C. Organización Pan-Americana da Saúde, 2019.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Atlas Interativo de Leishmaniose nas Américas: aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais**. Washington, D.C. Organização Pan-Americana da Saúde, 2021a.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Leishmanioses: Informe epidemiológico nas Américas**. n. 10, dez. 2021. Washington, D.C. OPAS, 2021b.

PENA, H. P. *et al.* Accuracy of diagnostic tests for American tegumentary leishmaniasis: a systematic literature review with meta-analyses. **Trop Med Int Health**, v. 25, n. 10, p.1168-1181, 2020.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**. 11 Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1982.

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

RIBEIRO, F. C. *et al.* Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of American tegumentary leishmaniasis in dogs. **Vet Parasitol.**, n.148, p. 200-206, 2007.

SATO, C. M. **Diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar americana causada por espécies diferentes de *Leishmania***. 2017. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Saúde Internacional). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

SCHOPENHAUER, A. **A arte de envelhecer**. 1a ed. São Paulo, Martins Fontes, 2012.

SILVA, S. S. **Identificação e avaliação de um novo antígeno recombinante para o diagnóstico sorológico da leishmaniose tegumentar**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

SOARES, V. B. *et al.* Spaces of production of cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Ciencia & Saude Coletiva**, v. 25, n. 8, p. 2961–2971, 2020.

VALE, E. C. S., FURTADO, T. **Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia**. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 80, p. 421–428, 2005.

VITA, G. F. *et al.* Status of the American Tegumentary Leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil, from 2004 to 2013. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

VOLTARELLI, J. C. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. 1a ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

VON STEBUT, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **European Journal Dermatology**. v.17, n. 2, p.115-22. 2007

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly Epidemiological Record: Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap**, v. 96, n. 35, p.

401-419, 2021.

ZANETTI, A. dos 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 São Paulo**, v. 61, 2019.

APÊNDICE A - SOLICITAÇÃO DE ISENÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto de pesquisa: Avaliação do ELISA *in house* no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pacientes Atendidos no Período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz.

Pesquisador Responsável: Ageu Quintanilha Viana Nascimento

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP) da Fundação Oswaldo Cruz:

Vimos por meio deste documento solicitar a dispensa de obtenção de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o estudo intitulado “Avaliação do ELISA *in house* no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pacientes Atendidos no Período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz” proposto por Ageu Quintanilha Viana Nascimento.

A dispensa do uso de TCLE se fundamenta:

- Por se tratar de um estudo transversal com avaliação retrospectiva de dados secundários (resultados sorológicos de ELISA “in house”, informações clínicas e laboratoriais contidas nos prontuários e nos bancos internos do Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses-LapClinVigiLeish) que foram previamente obtidos de pacientes com suspeita clínica de LTA atendidos ambulatório do LapClinVigileish no período de 2000 até 2005;
- Este estudo não utilizará amostras biológicas dos pacientes somente fonte de dados contidos nos prontuários e em banco de dados gerados pelo (LapClinVigiLeish);
- Os pacientes na ocasião do atendimento inicial assinaram TCLE para pesquisas relacionadas ao diagnóstico e / ou tratamento das Leishmanioses;
- Pela grande quantidade de pacientes neste recorte de tempo do estudo o que dificultaria o contato, já que a maioria não tem mais segmento de atendimento em ambulatório do LapClinVigiLeish;
- Para a pesquisa em questão não será necessária a identificação dos pacientes e os resultados da pesquisa serão avaliados e apresentados de forma agregada não permitindo a identificação individual dos participantes.

O pesquisador principal e demais colaboradores envolvidos no estudo acima se comprometem de forma individual e coletiva a utilizar os dados provenientes deste estudo apenas para os fins descritos e a cumprir todas as diretrizes e normas éticas regulamentadoras vigentes no que diz respeito ao sigilo e confidencialidade dos dados coletados.

Segundo os protocolos de pesquisa os riscos desta pesquisa são considerados mínimos.

Os riscos identificados são:

Os principais riscos identificados para essa pesquisa são:

Riscos Previsíveis:

- Extravio de informações
- Quebra de sigilo de dados confidenciais
- Integridade física dos prontuários

Para minimizar esses riscos serão adotadas as seguintes medidas:

- Serão retiradas, para construção dos dados, somente informações que serão necessárias para atender os objetivos desta pesquisa clínica (tamanho de lesão, extensão das lesões, quantidade de lesões e formas clínicas da doença) e informações dos resultados dos testes laboratoriais do ELISA in house, cultivo in vitro, exame direto/imprint, histopatologia e PCR para *Leishmania* spp.). A identificação dos pacientes será realizada pelo número de prontuário e iniciais do nome.
- Não serão necessárias as informações pessoais (idade, endereço, telefone), somente as iniciais do nome do paciente.
- O acesso aos bancos de dados já construídos e ao sistema de prontuários será realizado somente pelo aluno e pela orientadora principal, somente durante o período da montagem do banco de dados (por 2 meses), e somente serão consultadas informações clínicas dos pacientes que interessam para responder ao objetivo desta pesquisa.
- As planilhas geradas com os bancos de dados não serão colocadas em rede, sendo compartilhadas somente por e-mail institucional.
- Os pesquisadores envolvidos na confecção de um novo banco de dados estarão treinados no sentido de somente consultar as informações necessárias para cumprimento dos objetivos propostos neste projeto.
- Orientador e aluno assinaram termo de confidencialidade para utilização de dados para esse projeto denominado de Termo de Compromisso de Utilização dos Dados (TCUD);
- Será garantida a guarda do sigilo das informações clínicas de modo que para objetivos desta pesquisa não serão apresentadas como resultados informações individuais, somente informações agregadas dos dados.

Rio de Janeiro, 10 de Janeiro de 2023

APÊNDICE B - TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS (TCUD)

Eu, Ageu Quintanilha Viana Nascimento, aluno (mestrando) da Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz, do curso de Pós-graduação Stricto Sensu em Saúde Pública e Meio Ambiente no âmbito do projeto de pesquisa intitulado “Avaliação do ELISA *in house* no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pacientes Atendidos no Período de 2000 a 2005 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz”, comprometo-me com a utilização dos dados contidos no Sipec-INI (<http://intranet.ini.fiocruz.br>) e bancos internos do LapClinVigiLeis: Banco de sorologia humana; Humanos LTA banco de dados clínica; Humanos esporotricose banco de dados; Banco cultura, a fim de obtenção dos objetivos previstos, e somente após receber a aprovação do sistema CEP-CONEP.

Comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados nos (arquivos/prontuários/banco), bem como com a privacidade de seus conteúdos.

Esclareço que os dados a serem coletados se referem dados clínicos (exame físico dos pacientes), os dados dos resultados sorológicos (ELISA *in house*), dos resultados parasitológicos (cultivo *in vitro* do parasito, exame direto / imprint e histopatologia) e moleculares (PCR para *Leishmania* spp.) obtidos de pacientes com suspeita clínica de LTA atendidos no ambulatório do LapClinVigileish no período de 01/01/2000 a 31/12/2005.

Declaro entender que é minha a responsabilidade de cuidar da integridade das informações e de garantir a confidencialidade dos dados e a privacidade dos indivíduos que terão suas informações acessadas.

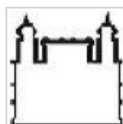
Também é minha a responsabilidade de não repassar os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, à pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa.

Por fim, comprometo-me com a guarda, cuidado e utilização das informações apenas para cumprimento dos objetivos previstos nesta pesquisa aqui referida. Qualquer outra pesquisa em que eu precise coletar informações serão submetidas a apreciação do CEP/ENSP.

Rio de Janeiro, 10 de janeiro de 2023.

Assinatura do pesquisador responsável
Ageu Quintanilha Viana Nascimento/MG-14.368.333

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do Elisa in house no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pacientes Atendidos no Período de 2000 a 2010 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz.

Pesquisador: AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 66793423.6.0000.5240

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.078.906

Apresentação do Projeto:

Este parecer se refere a análise de resposta às pendências, emitidas pelo CEP/ENSP no parecer número 6.060.844, emitido em 16/05/2023.

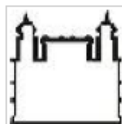
O projeto de pesquisa em tela obteve anteriormente o seguinte parecer consubstanciado do CEP/ENSP: 5.903.430, de 17/02/2023 (parecer de pendências).

Projeto de Dissertação de mestrado de Ageu Quintanilha Viana Nascimento, apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente da ENSP-FIOCRUZ, intitulado "Avaliação do Elisa in house no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pacientes Atendidos no Período de 2000 a 2010 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz". Projeto orientado por Fernanda Nunes Santos e Eliame Mouta Confort, com financiado próprio no valor de R\$9.700,00.

"A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada um grave problema de saúde pública e tem alta frequência nas Américas. A doença é causada por espécies de protozoários do gênero

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.041-210
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2863 **Fax:** (21)2598-2863 **E-mail:** cep@ensp.fiocruz.br

Página 2



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.078.906

Leishmania, subgêneros Viannia e Leishmania, transmitidos por vetor flebotomíneos de diferentes espécies do gênero Lutzomyia spp. Os métodos de diagnóstico mais utilizados no país ainda são os parasitológicos, que apesar da sua simplicidade

ainda apresentam dificuldades relacionadas a obtenção das amostras, técnicos especializados, e principalmente a presença de parasitos no material coletado. Entre os métodos imunológicos, destaca-se o ELISA que apresenta bom desempenho em pacientes com alta suspeição clínica e exame parasitológico negativo. A coleta e transporte de amostras para sua realização possui baixo grau de dificuldade. Diversos estudos em todo território nacional têm demonstrado bom desempenho desse teste no imunodiagnóstico da LTA. Esse trabalho busca realizar uma avaliação retrospectiva do desempenho do ELISA in house no imunodiagnóstico da LTA em pacientes atendidos no período de 2000 a 2010 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz-RJ, comparando resultados do ELISA in house com resultados parasitológicos e moleculares. Serão avaliadas ainda as respostas sorológicas dos pacientes com LTA nas formas cutânea, mucosa, mucosa-cutânea e disseminada e a associação de características clínicas da LTA e resposta sorológica do ELISA in house. Trata-se de um estudo transversal com avaliação de dados previamente obtidos de pacientes com suspeita clínica de LTA atendidos no ambulatório do LapClinVigiLeish. Serão analisados os dados clínicos (características clínicas das lesões), resultados sorológicos (ELISA in house), resultados parasitológicos (cultivo in vitro do parasito, exame direto / imprint e histopatologia) e resultados moleculares (PCR para Leishmania spp.)."

Metodologia Proposta:

"Serão usados os dados clínicos (características clínicas das lesões), os dados dos resultados sorológicos (ELISA in house), dos resultados parasitológicos (cultivo in vitro do parasito, exame direto / imprint e histopatologia) e moleculares (PCR para Leishmania spp.). Para este estudo, não será necessária a coleta de amostras clínicas ou de dados recentes, as informações a serem utilizadas serão dados secundários contidos em arquivos/ bancos de dados internos já construídos do LapClinVigiLeish e a consulta de prontuários, para obtenção de informações clínicas, quando necessária, será realizada através do Sipec-INI (<http://intranet.ini.fiocruz.br>)."

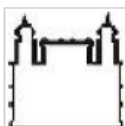
Tamanho amostral: 2.000 participantes

Critério de Inclusão:

"Será definido como critério de inclusão neste estudo todos os pacientes com suspeita de LTA

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2883 Fax: (21)2598-2883 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br

Página 3



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.078.906

atendidos no ambulatório do LapClinVigiLeish, em processo de diagnóstico, que tenham sido submetidos a coleta de sangue para realização do ELISA e submetidos ainda ao protocolo de atendimento e diagnóstico realizado pelo setor, na primeira consulta, sem a instituição do tratamento."

Critério de Exclusão:

"Os pacientes atendidos no ambulatório do LapClinVigiLeish que não foram submetidos ao ELISA ou ao protocolo diagnóstico do setor, os pacientes encaminhados já em tratamento e resultados de ELISA provenientes de amostras externas ao LapClinVigiLeish para o diagnóstico de LTA, serão excluídos deste estudo."

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador, os objetivos da pesquisa são:

Objetivo Primário:

Avaliar o desempenho do ELISA in house no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em pacientes atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas na Fiocruz no período de 2000 a 2010.

Objetivo Secundário:

- Comparar os resultados do ELISA in house com o cultivo parasitológico, a histopatologia, o exame direto (Imprint) e a PCR para *Leishmania spp.*
- Avaliar as respostas sorológicas dos pacientes com LTA nas formas cutânea, mucosa, mucosa-cutânea e disseminada;
- Avaliar a associação entre as características clínicas das lesões de LTA e a resposta sorológica no ELISA in house."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo o Pesquisador:

Riscos:

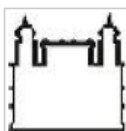
"Riscos Previsíveis: - Extravio de informações - Quebra de sigilo de dados confidenciais - Integridade física dos prontuários.

Para minimizar esses riscos serão adotadas as seguintes medidas:

- Serão retiradas, para construção dos dados, somente informações que serão necessárias para

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2863 Fax: (21)2598-2863 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br

Página 4



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.078.908

atender os objetivos desta pesquisa clínica (tamanho de lesão, extensão das lesões, quantidade de lesões e formas clínicas da doença) e informações dos resultados dos testes laboratoriais do ELISA in house, cultivo in vitro, exame direto/imprint, histopatologia e PCR para Leishmania spp.).

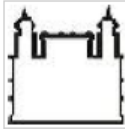
- A identificação dos pacientes será realizada pelo número de prontuário e iniciais do nome.
- Não serão necessárias as informações pessoais (idade, endereço, telefone), somente as iniciais do nome do paciente.
- O acesso aos bancos de dados já construídos e ao sistema de prontuários será realizado somente pelo aluno e pela orientadora principal, somente durante o período da montagem do banco de dados (por 2 meses), e somente serão consultadas informações clínicas dos pacientes que interessam para responder ao objetivo desta pesquisa.
- As planilhas geradas com os bancos de dados não serão colocadas em rede, sendo compartilhadas somente por e-mail institucional.
- Os pesquisadores envolvidos na confecção de um novo banco de dados estarão treinados no sentido de somente consultar as informações necessárias para cumprimento dos objetivos propostos neste projeto.
- Orientador e aluno assinaram termo de confidencialidade para utilização de dados para esse projeto denominado de Termo de Compromisso de Utilização dos Dados (TCUD);
- Será garantida a guarda do sigilo das informações clínicas de modo que para objetivos desta pesquisa não serão apresentadas como resultados informações individuais, somente informações agregadas dos dados".

Benefícios:

- "01- Contribuir para maior especificidade e qualidade no diagnóstico da LTA;
- 02- Avaliação da acurácia e desempenho do ELISA para diagnóstico da LTA;
- 03- Ampliar as opções diagnósticas para a LTA;
- 04- Revisão de métodos diagnósticos já recomendados, com avaliação da sua confiabilidade e validade para estabelecer o diagnóstico diferencial da LTA para outras doenças;
- 05- Contribuir para atualização da literatura quanto a capacidade do ELISA ser adotado como método diagnóstico em qualquer fase da LTA, ou apenas na fase grave da doença utilizando uma amostragem ampla e longitudinal".

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2883 Fax: (21)2598-2883 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br

Página 5



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.078.906

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O protocolo de pesquisa apresenta todos os elementos necessários e adequados à apreciação ética e a pendência emitida no parecer anterior foi atendida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para responder ao parecer anterior, foi submetido o formulário de resposta às pendências nomeado Formularioresppendparecer6060844.pdf, postado em 18/05/2023;

Os demais documentos apresentados para esta análise constam listados ao final deste parecer.

Destacam-se os seguintes documentos aprovados:

- Termo de Compromisso de Utilização de Dados, nomeado FORMULARIO_TCUD_AGEU_QUINTANILHA_VIANA_NASCIMENTO.pdf, postado em 18/05/2023;

- Projeto detalhado, nomeado Projeto_Detalhado_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf, postado em 04/05/2023;

- Termo de Anuência Institucional, nomeado CARTA_DE_ANUENCIA_INSTITUICAO_CO_PARTICIPANTE_INI.pdf, postado em 22/04/2023;

- Declaração de Cessão de Banco de Dado, nomeado Termo_Autorizacao_Uso_Banco_de_Dados.pdf, postado em 02/05/2023.

Recomendações:

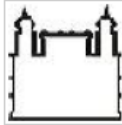
Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Para elaboração deste parecer, a pendência emitida no parecer consubstanciado número : 6.060.844, de 16/05/2023, foi analisada conforme abaixo:

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2863 Fax: (21)2598-2863 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br

Página 6



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.078.906

2. Item de pendência: O proponente refere ter anexado o documento Termo_Autorizacao_Uso_Banco_de_Dados.pdf em resposta à pendência. No entanto, o referido documento consiste em autorização da instituição para uso do banco de dados, e não o TERMO DE COMPROMISSO PARA UTILIZAÇÃO DE DADOS (TCUD), a ser assinado pelo próprio proponente, conforme explicitado na pendência 2. Atentar para a documentação correta e observar o modelo disponível no site do CEP/ENSP, conforme indicado. Submeter o TCUD à Plataforma Brasil.

Resposta do pesquisador: "O Termo de Compromisso de Utilização de Dados foi anexado na plataforma."

ANÁLISE DO CEP: PENDÊNCIA ATENDIDA

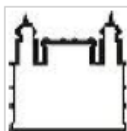
O protocolo do projeto de pesquisa ora apresentado contempla os quesitos éticos necessários, estando apto a ser iniciado a partir da presente data de emissão deste parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

ATENÇÃO: ***CASO OCORRA ALGUMA ALTERAÇÃO NO FINANCIAMENTO DO PROJETO ORA APRESENTADO (ALTERAÇÃO DE PATROCINADOR, COPATROCÍNIO, MODIFICAÇÃO NO ORÇAMENTO), O PESQUISADOR TEM A RESPONSABILIDADE DE SUBMETTER UMA EMENDA AO CEP SOLICITANDO AS ALTERAÇÕES NECESSÁRIAS. A NOVA FOLHA DE ROSTO A SER GERADA DEVERÁ SER ASSINADA NOS CAMPOS PERTINENTES E A VIA ORIGINAL DEVERÁ SER ENTREGUE NO CEP. ATENTAR PARA A NECESSIDADE DE ATUALIZAÇÃO DO CRONOGRAMA DA PESQUISA. CASO O PROJETO SEJA CONCORRENTE DE EDITAL, SOLICITA-SE ENCAMINHAR AO CEP, PELA PLATAFORMA BRASIL, COMO NOTIFICAÇÃO, O COMPROVANTE DE APROVAÇÃO. PARA ESTES CASOS, A LIBERAÇÃO PARA O INÍCIO DO TRABALHO DE CAMPO (COLETA DE DADOS, ABORDAGEM DE POSSÍVEIS PARTICIPANTES ETC.) ESTÁ CONDICIONADA À APRESENTAÇÃO DA FOLHA DE ROSTO, ASSINADA PELO PATROCINADOR, EM ATÉ 15 (QUINZE) DIAS APÓS A DIVULGAÇÃO DO RESULTADO DO EDITAL AO QUAL O PROJETO FOI SUBMETIDO. ***

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2863 Fax: (21)2598-2863 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br

Página 7



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.078.906

Verifique o cumprimento das observações a seguir:

1* Em atendimento a Resolução CNS nº 466/2012, cabe ao pesquisador responsável pelo presente estudo elaborar e apresentar ao CEP RELATÓRIOS PARCIAIS (semestrais) e FINAL. Os relatórios compreendem meio de acompanhamento pelos CEP, assim como outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa. O relatório deverá ser enviado pela Plataforma Brasil em forma de "notificação". Os modelos de relatórios (parciais e final) que devem ser utilizados encontram-se disponíveis na página eletrônica do CEP/ENSP (<https://cep.ensp.fiocruz.br/>)

2* Qualquer necessidade de modificação no curso do projeto deverá ser submetida à apreciação do CEP, como EMENDA. Deve-se aguardar parecer favorável do CEP antes de efetuar a/s modificação/ões.

3* Justificar fundamentadamente, caso haja necessidade de interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

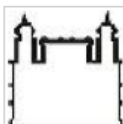
4* O Comitê de Ética em Pesquisa não analisa aspectos referentes a direitos de propriedade intelectual e ao uso de criações protegidas por esses direitos. Recomenda-se que qualquer consulta que envolva matéria de propriedade intelectual seja encaminhada diretamente pelo pesquisador ao Núcleo de Inovação Tecnológica da Unidade.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	AgeuQuintanilhaVianaNascimento_FR.pdf	24/05/2023 23:42:42	Cassius Schnell Palhano Silva	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_2076185.pdf	18/05/2023 10:05:43		Aceito
Outros	Formularioresppendparecer6060844.pdf	18/05/2023 10:05:20	AGEU QUINTANILHA VIANA	Aceito

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2883 Fax: (21)2598-2883 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br

Página 8



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ

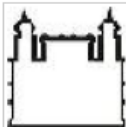


Continuação do Parecer: 6.078.908

Outros	Formulariosppendparecer6060844.pdf	18/05/2023 10:05:20	NASCIMENTO	Aceito
Outros	FORMULARIO_TCUD_AGEU_QUINTANILHA_VIANA_NASCIMENTO.pdf	18/05/2023 10:02:38	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf	04/05/2023 21:38:59	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	formulariosppendparecer5903430.pdf	04/05/2023 21:37:55	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf	02/05/2023 19:12:27	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento_MODIFICADO.pdf	02/05/2023 19:11:10	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	Requerimento_SECA_PRORROGACAO.pdf	22/04/2023 12:59:35	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	CARTA_DE_ANUENCIA_INSTITUICAO_CO_PARTICIPANTE_INI.pdf	22/04/2023 12:58:42	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	Formulario_de_Encaminhamento_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf	24/01/2023 19:59:19	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf	24/01/2023 19:58:51	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Declaração de concordância	Termo_Autorizacao_Uso_Banco_de_Dados.pdf	24/01/2023 19:49:46	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	FORMULARIO_TCU_AGEU_QUINTANILHA_VIANA_NASCIMENTO.pdf	16/01/2023 14:47:13	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de	INSENCAO_TCLE_AGEU_QUINTANIL	16/01/2023	AGEU	Aceito

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos CEP: 21.041-210
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2863 Fax: (21)2598-2863 E-mail: cep@ensp.fiocruz.br

Página 9



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE
PÚBLICA SERGIO AROUCA -
ENSP/ FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.078.906

Assentimento / Justificativa de Ausência	A_VIANA_NASCIMENTO.pdf	14:46:37	QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
--	------------------------	----------	------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 24 de Maio de 2023

Assinado por:
Cassius Schnell Palhano Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - Térreo
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.041-210
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2598-2863 **Fax:** (21)2598-2863 **E-mail:** cep@ensp.fiocruz.br

ANEXO B – PARECER ELABORADO PELA INSTITUIÇÃO COPARTICIPANTE

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do Elisa in house no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em Pacientes Atendidos no Período de 2000 a 2010 no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz.

Pesquisador: AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66793423.6.3001.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.124.576

Apresentação do Projeto:

Os tópicos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram extraídos do documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2076185.pdf, postados em 18/05/2023.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é considerada um grave problema de saúde pública e tem alta frequência nas Américas. A doença é causada por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, transmitidos por vetor flebotomíneos de diferentes espécies do gênero *Lutzomyia* spp. Os métodos de diagnóstico mais utilizado no país ainda são os parasitológicos, que apesar da sua simplicidade ainda apresentam dificuldades relacionadas a obtenção das amostras, técnicos especializados, e principalmente a presença de parasitos no material coletado. Entre os métodos imunológicos, destaca-se o ELISA que apresenta bom desempenho em pacientes com alta suspeição clínica e exame

parasitológico negativo. A coleta e transporte de amostras para sua realização possui baixo grau de dificuldade. Diversos estudos em todo território nacional têm demonstrado bom desempenho desse teste no imunodiagnóstico da LTA. Esse trabalho busca realizar uma avaliação retrospectiva do desempenho do Elisa in house no imunodiagnóstico da LTA em pacientes atendidos no período de 2000 a 2010 no Instituto Nacional de Infectologia

Endereço: Avenida Brasil 4365, sala 102 do andar térreo do Pavilhão José Rodrigues da Silva
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-900
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 **E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

Página 2

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.124.576

Evandro Chagas/Fiocruz-RJ, comparando resultados do ELISA in house com resultados parasitológicos e moleculares. Serão avaliadas ainda as respostas sorológicas dos pacientes com LTA nas formas cutânea, mucosa, mucosa-cutânea e disseminada e a associação de características clínicas da LTA e resposta sorológica do ELISA in house. Trata-se de um estudo transversal com avaliação de dados previamente obtidos de pacientes com suspeita clínica de LTA atendidos no ambulatório do LapClinVigiLeish. Serão analisados os dados clínicos (características clínicas das lesões), resultados sorológicos (ELISA in house), resultados parasitológicos (cultivo in vitro do parasito, exame direto / imprint e histopatologia) e resultados moleculares (PCR para Leishmania spp.)

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o desempenho do ELISA in house no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana em pacientes atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas na Fiocruz no período de 2000 a 2010.

Objetivo Secundário:

- Comparar os resultados do ELISA in house com o cultivo parasitológico, a histopatologia, o exame direto (Imprint) e o PCR para Leishmania spp.
- Avaliar as respostas sorológicas dos pacientes com LTA nas formas cutânea, mucosa, mucosa-cutânea e disseminada;- Avaliar a associação entre as características clínicas das lesões de LTA e a resposta sorológica no ELISA in house;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos Previsíveis: -Extravio de informações -Quebra de sigilo de dados confidenciais-Integridade física dos prontuários.

Para minimizar esses riscos serão adotadas as seguintes medidas:

- Serão retiradas, para construção dos dados, somente informações que serão necessárias para atender os objetivos desta pesquisa clínica (tamanho de lesão, extensão das lesões, quantidade de lesões e formas clínicas da doença) e informações dos resultados dos testes laboratoriais do ELISA in house, cultivo in vitro, exame direto/imprint, histopatologia e PCR para Leishmania spp.)
- A identificação dos pacientes será realizada pelo número de prontuário e iniciais do nome.
- Não serão necessárias as informações pessoais (idade, endereço, telefone), somente as iniciais do

Endereço: Avenida Brasil 4365, sala 102 do andar térreo do Pavilhão José Rodrigues da Silva
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-900
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3885-9585 **E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

Página 3

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.124.576

nome do paciente.

- O acesso aos bancos de dados já construídos e ao sistema de prontuários será realizado somente pelo aluno e pela orientadora principal, somente durante o período da montagem do banco de dados (por 2 meses), e somente serão consultadas informações clínicas dos pacientes que interessam para responder ao objetivo desta pesquisa.

-As planilhas geradas com os bancos de dados não serão colocadas em rede, sendo compartilhadas somente por e-mail institucional.

-Os pesquisadores envolvidos na confecção de um novo banco de dados estarão treinados no sentido de somente consultar as informações necessárias para cumprimento dos objetivos propostos neste projeto.

-Orientador e aluno assinaram termo de confidencialidade para utilização de dados para esse projeto denominado de Termo de Compromisso de Utilização dos Dados (TCUD);

- Será garantida a guarda do sigilo das informações clínicas de modo que para objetivos desta pesquisa não serão apresentadas como resultados informações individuais, somente informações agregadas dos dados.

Benefícios:

01-Contribuir para maior especificidade e qualidade no diagnóstico da LTA ;02- Avaliação da acurácia e desempenho do ELISA para diagnóstico da LTA03-Ampliar as opções diagnósticas para a LTA;04-Revisão de métodos diagnósticos já recomendados, com avaliação da sua confiabilidade e validade para estabelecer o diagnóstico diferencial da LTA para outras doenças;05- Contribuir para atualização da literatura quanto a capacidade do ELISA ser adotado como método diagnóstico em qualquer fase da LTA, ou apenas na fase grave da doença utilizando uma amostragem ampla e longitudinal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, de interesse no contexto epidemiológico brasileiro.

Bem fundamentada, com metodologia detalhada e definição clara dos riscos e benefícios resultantes da pesquisa.

O INI/Fiocruz é coparticipante. Esse projeto já foi aprovado pelo CEP da ENSP/Fiocruz com número do parecer substanciado em 6.078.906 EM 24/05/2023.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Endereço: Avenida Brasil 4385, sala 102 do andar térreo do Pavilhão José Rodrigues da Silva
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-900
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 **E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

Página 4

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.124.576

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há óbice ético à aprovação do PROJETO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	AgeuQuintanilhaVianaNascimento_FR.pdf	24/05/2023 23:42:42	Cassius Schnell Palhano Silva	Aceito
Outros	Formularioresppendparecer6060844.pdf	18/05/2023 10:05:20	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	FORMULARIO_TCUD_AGEU_QUINTANILHA_VIANA_NASCIMENTO.pdf	18/05/2023 10:02:38	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf	04/05/2023 21:38:59	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	formularioresppendparecer5903430.pdf	04/05/2023 21:37:55	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf	02/05/2023 19:12:27	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_Ageu_Quintanilha_Viana_Nascimento_MODIFICADO.pdf	02/05/2023 19:11:10	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	Requerimento_SECA_PRORROGACAO.pdf	22/04/2023 12:59:35	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	CARTA_DE_ANUENCIA_INSTITUICAO_CO_PARTICIPANTE_INI.pdf	22/04/2023 12:58:42	AGEU QUINTANILHA VIANA	Aceito

Endereço: Avenida Brasil 4365, sala 102 do andar térreo do Pavilhão José Rodrigues da Silva
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-900
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3885-9585 **E-mail:** cep@ini.fiocruz.br

Página 5

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 6.124.576

Outros	CARTA_DE_ANUENCIA_INSTITUICAO CO_PARTICIPANTE_INI.pdf	22/04/2023 12:58:42	NASCIMENTO	Aceito
Outros	Formulario_de_Encaminhamento_Ageu _Quintanilha_Viana_Nascimento.pdf	24/01/2023 19:59:19	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
Outros	FORMULARIO_TCU_AGEU_QUINTANI LHA_VIANA_NASCIMENTO.pdf	16/01/2023 14:47:13	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	INSENCÃO_TCLE_AGEU_QUINTANIL HA_VIANA_NASCIMENTO.pdf	16/01/2023 14:46:37	AGEU QUINTANILHA VIANA NASCIMENTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 16 de Junho de 2023

Assinado por:
Sandra Wagner Cardoso
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil 4365, sala 102 do andar térreo do Pavilhão José Rodrigues da Silva
Bairro: Manginhos CEP: 21.040-900
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3885-9585 E-mail: oep@ini.fiocruz.br